

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
Keemia instituut

HEGNE PUPART

**Proteiinkinaaside spottimine pinnale  
ja kvantifitseerimine ARC-tüüpi sondiga**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja: Taavi Ivan, MSc

Tartu 2017

## Infoleht

### **Proteiinkinaaside spottimine pinnale ja kvantifitseerimine ARC-tüüpi sondiga**

Töö eesmärgiks oli uurida ARC-tüüpi sondiga proteiinkinaasi (PK) aktiivse hulga määramise võimalikkust proovi pinnale adsorbeerimise kaudu. Optimaalsete tingimuste leidmiseks uuriti muuhulgas erinevate pindade sidumismahtu, lahuse komponentide ja inkubeerimisaja pikkuse mõju katseetappides. Meetodit katsetati kolme erineva kinaasiga: PKAc, ROCK2 ning MSK1.

Tutvustatav meetod on lihtsa teostatavusega ja võimaldab tuvastada aktiivse kinaasi hulka pikomoolides. Kuigi ARC-sondi põhise tuvastusmeetodiga, esinesid võrdlemisi suured erinevused paralleelkatsetes. Leiti, et adsorbeerunud aktiivse PK analüüsimine on võimalik. Meetodit saab rakendada erinevate PK-de puhul paralleelselt ja töö käigus selgunud tingimuste mõju annab olulist teavet meetodi edasiarendamiseks.

Võtmesõnad: PK (proteiinkinaas), ARC (nukleosiidi analoogi ja oligopeptiidi konjugaat), Ig (immunoglobuliin), ELISA (immunoensüümmeetod).

CERCS kood: P310 proteiinid, ensümolooia

### **Spotting of protein kinases and quantification by ARC-type probes**

The aim of the current Bachelor's thesis was to study a novel method by adsorbing protein kinase (PK) onto a surface and determine the active concentration by ARC-type probe. Numerous tests were carried out to find out suitable components and concentrations of the solutions among other conditions in distinct phases of the experiment. Three protein kinases, PKAc, ROCK2 and MSK1 were characterized in the novel method.

Considering the simplicity of the method, the low volume and submicromolar detection limit allows the discovery of active concentration of the PK in picomoles. However, ARC-based detection entailed relatively large difference between parallels and non-specific signal showed irregularities. This study shows that the determination of active concentration of several PK-s is possible by simple adsorption of samples and detection by low-molecular ARC-probe.

Keywords: PK (protein kinase), ARC (adenosine-arginine conjugate), Ig (immunoglobulin), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

CERCS code: P310 proteins, enzymology

## Kasutatud lühendid

| Lühend | Inglisekeelne nimetus  | Eestikeelne nimetus  |
|--------|--|--|
| AF 647 | <u>A</u> lexa <u>F</u> luor 647  | Alexa Fluor 647  |
| AGC    | <i>group of cyclic nucleotide- and calcium-phospholipid-dependent kinases containing <u>PKA</u>, <u>PKG</u>, <u>PKC</u> families</i> | tsükliliste nukleotiid- ja kaltsium-fosfolipiid-sõltuvate kinaaside rühm, mis sisaldab kinaaside PKA, PKG, PKC perekondi |
| ARC    | <i>conjugate of adenosine analogue and arginine-rich peptide</i>   | adenosiini analoogi ja oligo-arginiini konjugaat   |
| ATP    | <u>a</u> denosine 5'- <u>t</u> riphosphate   | adenosiin-5'-trifosfaat  |
| BSA    | <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin   | veiseseerumi albumiin  |
| CaMK   | <u>Ca</u> <sup>2+</sup> / <u>cal</u> modulin-dependent kinases   | Ca <sup>2+</sup> /kalmoduliin-sõltuvad kinaasid  |
| cAMP   | <u>c</u> yclic adenosine <u>m</u> onophosphate   | tsükliline adenosiinmonofosfaat  |
| CDK    | <u>c</u> yclin- <u>d</u> ependent <u>k</u> inase   | tsükliin-sõltuv kinaas   |
| CK1    | <u>c</u> asein <u>k</u> inase 1  | kaseiinkinaas 1  |
| CLK    | <u>C</u> DC2- <u>l</u> ike <u>k</u> inase  | CDC2-sarnane kinaas  |
| CMGC   | <i>group including <u>CDK</u>, <u>MAPK</u>, <u>GSK</u> and <u>CDK</u> kinases</i>  | rühm, mis sisaldab CDK, MAPK, GSK ja CLK proteiinkinaase   |
| ELISA  | <u>e</u> nzyme- <u>l</u> inked <u>i</u> mmuno <u>s</u> orbent <u>a</u> ssay  | ensüüm-immunosorptsioonanalüüs, immunoensüümmeetod   |
| EM     | <u>e</u> mission   | emission   |
| EX     | <u>e</u> xcitation   | ergastus   |
| FDA    | <u>F</u> ood and <u>D</u> rug <u>A</u> dministration   | Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviamet   |
| FI     | <u>f</u> luorescence <u>i</u> ntensity   | fluorestsentsintensiivsus  |
| GSK    | <u>g</u> lycogen <u>s</u> ynthase <u>k</u> inases  | glükogeeni süntaasi kinaas   |
| HEPES  | [4-(2- <u>h</u> ydroxy <u>e</u> thyl) <u>p</u> iperazin-1-yl] <u>e</u> thane <u>s</u> ulfonic acid                                   | 4-(2-hüdroksüetüül)-1-piperasiinetaansulfoonhape   |
| Ig     | <u>i</u> mmunoglobulin   | immunoglobuliin  |
| LoD    | <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>d</u> etection   | avastamispiir  |
| LoQ    | <u>l</u> imit <u>o</u> f <u>q</u> uantitation  | määramispiir   |

| Lühend       | Inglisekeelne nimetus   | Eestikeelne nimetus   |
|--------------|---|---|
| MAPK         | <i>mitogen-activated protein kinase</i>                         | mitogeen-aktiveeritud<br>proteiinkinaasid                     |
| MSK = RLPK   | <i>mitogen and stress activated protein kinase</i>              | mitogeen- ja stressaktiveeritud<br>proteiinkinaas             |
| MQ           | <i>Milli-Q</i>  | Milli-Q kvaliteediga ülipuhas vesi                            |
| P20          | <i>Tween 20</i>   | Tween 20  |
| PDL          | <i>poly-D-lysine</i>  | polü-D-lüsiin   |
| PEG          | <i>polyethylene glycol</i>                                      | polüetüleen glükool   |
| PF 647       | <i>Promo Fluor 647</i>  | Promo Fluor 647   |
| Pim1         | <i>proto-oncogene serine/threonine-protein</i>                  | proto-onkogeen seriini/treoniini<br>proteiinkinaas            |
| PK           | <i>protein kinase</i>   | proteiinkinaas  |
| PKA          | <i>cAMP-dependent protein kinase</i>                            | cAMP-sõltuv proteiinkinaas                                    |
|              | <i>catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase</i> | PKA katalüütiline alaühik                                     |
| PKA $\alpha$ | <i><math>\alpha</math> isoform of PKA<math>\alpha</math></i>    | PKA katalüütiline alaühik, $\alpha$ -isovorm                  |
| PKB          | <i>protein kinase B</i>   | proteiinkinaas B  |
| PKC          | <i>protein kinase C</i>   | proteiinkinaas C  |
| PKG          | <i>protein kinase G</i>   | proteiinkinaas G  |
| Rho          | <i>homologue of small GTPase Ras</i>                            | GTPaasi Ras homoloog  |
| ROCK         | <i>Rho-dependent protein kinase</i>                             | Rho-sõltuv proteiinkinaas                                     |
| RSK          | <i>ribosomal s6 kinase</i>                                      | ribosomaalne s6 kinaas  |
| SPR          | <i>surface plasmon resonance</i>                                | pinnaplasmonresonants   |
| STE          | <i>yeast Sterile 7, Sterile 11, and Sterile 20 kinases</i>      | pärmi Sterile 7, Sterile 11 ja Sterile 20<br>proteiinkinaasid |
| TK           | <i>tyrosine kinases</i>   | türosiinkinaasid  |
| TKL          | <i>tyrosine kinase-like kinases</i>                             | türosiinkinaaside sarnased kinaasid                           |

# Sisukord

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1      | Sissejuhatus.....   | 7  |
| 2      | Kirjanduse ülevaade.....  | 8  |
| 2.1    | Proteiinkinaasid .....  | 8  |
| 2.2    | Proteiinkinaaside inhibiitorid .....                                | 10 |
| 2.2.1  | ARC-tüüpi ühendid .....   | 11 |
| 2.3    | Antikehad.....  | 12 |
| 2.4    | ELISA .....   | 13 |
| 2.5    | SPR .....   | 15 |
| 2.6    | Pinnad .....  | 16 |
| 3      | Eksperimentaalne osa.....   | 18 |
| 3.1    | Kasutatud seadmed ja abivahendid.....                               | 18 |
| 3.2    | Kasutatud ained .....   | 19 |
| 3.3    | Meetodi optimeerimine.....  | 19 |
| 3.3.1  | Mikroplaadi valik spottimiskatseteks.....                           | 19 |
| 3.3.2  | SA plaadi sidumismaht.....  | 20 |
| 3.3.3  | Spottimise tehnikate uurimine.....                                  | 20 |
| 3.3.4  | Spottipuhvri mõju.....  | 20 |
| 3.3.5  | Pesemispuhvri mõju antikeha-kinaasi kompleksile .....               | 20 |
| 3.3.6  | Pesemispuhvri mõju kinaasi-ARC-i kompleksile .....                  | 20 |
| 3.3.7  | Lisapesude katsetamine ARC-1063:PKAc signaali intensiivsusele ..... | 21 |
| 3.3.8  | Tuvastusreagendi puhverlahuse mõju kinaasi-ARC-i kompleksile .....  | 21 |
| 3.3.9  | Tuvastusreagendi kontsentratsioon .....                             | 21 |
| 3.3.10 | Kinaasi spottide kuivamise mõju .....                               | 21 |
| 3.3.11 | BSA lahuse inkubatsiooniaja mõju .....                              | 21 |
| 3.3.12 | Tuvastusreagendi inkubatsiooniaja mõju .....                        | 21 |
| 3.3.13 | Mõõtmistingimuste optimeerimine fluorestsentskanneril .....         | 22 |
| 3.4    | Proteiinkinaaside aktiivse kontsentratsiooni määramine.....         | 22 |
| 3.5    | Antikeha/ARC-i ja kinaasi kompleksi tuvastamine.....                | 22 |
| 3.6    | Kinaasi lahjendusseeria ning tuvastamine antikehaga.....            | 22 |
| 3.7    | Antikeha selektiivsuse katse .....                                  | 22 |
| 4      | Tulemused ja arutelu.....   | 23 |

|      |  |    |
|------|--|----|
| 4.1  | Mikroplaadi valik spottimiskatseteks .....   | 23 |
| 4.1  | Spottimise tehnikad .....  | 24 |
| 4.2  | Spottimispuhvri mõju .....   | 25 |
| 4.3  | Pesemispuhvrite mõju.....  | 26 |
| 4.4  | P20 mõju fluorestsentsi intensiivsusele ARC-sondi visualiseerimislahuses .....                         | 27 |
| 4.5  | SA pinna sidumismaht.....  | 28 |
| 4.6  | Tuvastusreagendi kontsentratsioon.....   | 28 |
| 4.7  | Optimeerimiskatsete kokkuvõte .....  | 30 |
| 4.8  | Proteiinkinaaside kvantifitseerimine ARC-tüüpi sondidega ning aktiivse kinaasi hulga tuvastamine ..... | 31 |
| 4.9  | PKAc määramise võrdlus ARC-sondi ning antikehaga .....   | 33 |
| 4.10 | Antikeha selektiivsuse tuvastamine .....   | 33 |
| 5    | Kokkuvõte.....   | 35 |
| 6    | Summary .....  | 36 |
| 7    | Kasutatud kirjandus .....  | 37 |
| 8    | Lisad.....   | 42 |

# 1 Sissejuhatus

Elusorganism on tervik, mille toimimiseks peavad kõik organismi komponendid olema tasakaalus ning tegutsema eesmärgipäraselt. Üheks olulisemaks komponendiks inimese organismis on keerulise struktuuriga ning bioloogilise spetsiifilisusega valgud ehk proteiinid. Sõna „proteiin“ tuleb kreekakeelsest sõnast *protos* – esimene, tähtsaim, mis juba iseloomustab valkude tähtsust organismis.

Olulised valgud on ensüümid, biokatalüsaatorid, milleta eluks vajalikud bioloogilised ja keemilised protsessid ja reaktsioonid toimuksid väga aeglaselt või üldse mitte. Ensüümid on liikumapanev jõud, mis juhib ja koordineerib keha keemilisi reaktsioone ja protsesse.

Ka ensüümide puhul on oluline, et need toimiksid eesmärgipäraselt. Transferaaside klassi kuuluvate ensüümide proteiinkinaaside liigne aktiivsus võib põhjustada mitmeid haiguseid. Liigse aktiivsuse alandamiseks kasutatakse inhibiitoreid – aineid, mis alandavad ensüümatalüüsitud reaktsioonide kiirust. Proteiinkinaaside inhibiitorid on terapeutiliselt tähtsad, kuna nendega on võimalik blokeerida ensüümi katalüütiline tasku ning seeläbi inhibeerida katalüütilist toimet.

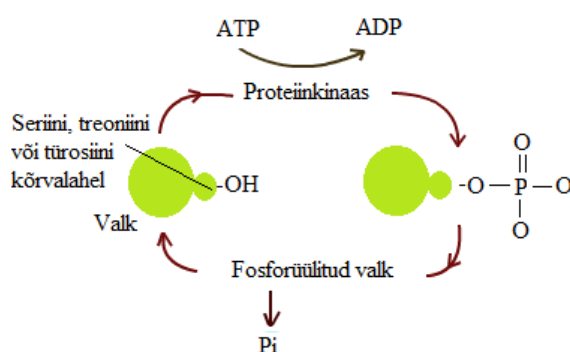
Proteiinkinaaside inhibiitorite arendamine, kasutamine ravimitena ja bioloogiliste vahenditena toob paralleelselt kaasa ka vajaduse odavate ja mugavate meetodite järele. Käesoleva töö eesmärgiks on uurida ARC-tüüpi sondi põhist proteiinkinaasi aktiivse hulga määramise võimalikkust, adsorbeerides proteiinkinaasi sisaldava proovi pinnale. Töö käigus iseloomustatakse erinevate pindade mittespetsiifilist sidumismahtu, optimeeritakse lahuste komponente ja tingimusi erinevates katseetappides ning mõõtmistingimusi fluorestsentskanneril.

## 2 Kirjanduse ülevaade

### 2.1 Proteiinkinaasid

Proteiinkinaasid (PK-d) on transferaaside klassi kuuluvad ensüümid, mis katalüüsivad valkude pöördumat fosforüülimisreaktsiooni. Fosforüülimine järgneb nukleotiidi (tavaliselt ATP) ja sihtmärk-valgu seondumisele ensüümi aktiivtsentrile, mille käigus kantakse terminaalne fosforüülrühm ATP-Mg<sup>2+</sup> kompleksilt üle aktseptorile, valgu aminohappejäägile (Joonis1). Enamus PK-sid fosforüülib valgu seriini ja/või treoniini jääke (384 PK-d) ning suur osa türosiini jääke (95 PK-d). Lisaks on kaksikspetsiifilisusega PK-d, mis fosforüülib nii türosiini kui ka seriini/treoniini jääke (21 PK-d). Inimese genoomis on üks PK, mis fosforüülib histidiini jääke. Valksubstraadi fosforüleerimine kutsub esile tertsiaarse struktuuri muutuse, mis muudab valgusubstraadi aktiivsust, paigutust rakus või interaktsioone teiste valkudega. [1–3]

Umbes 10% inimese PK-dest on pseudo-kinaasid, mis on kas inaktiivsed või vähese aktiivsusega. Pseudo-kinaasidel puudub katalüütilises domeenis vähemalt üks kolmest jäägist, mis on hädavajalikud katalüüsi jaoks, seega puudub neil võime fosforüülda valksubstraate. [4,5]



**Joonis 1.** Valgu fosforüleerimise skeem, mille käigus kantakse ATP  $\gamma$ -fosforüülrühm valgu seriini, treoniini või türosiini jäägile.

PK-del on rakkudes keskne roll valkude funktsioonide reguleerimisel. PK-d on seotud signaaliradadega, mis reguleerivad rakkude kasvamist, paljunemist ja ka surma. Hinnanguliselt ühel kolmandikul eukarüootsete rakkude valkude aktiivsusest on reguleeritud ühe või rohkema seriini, treoniini või türosiini jäägi fosforüülimise kaudu. Kõrvalekalded normaalsest fosforüülimisest ja PK-de aktiivsusest võib muuta raku funktsioone ja sellega põhjustada erinevaid haigusi. PK-de signaalihäiretega seostatakse üle 400 haiguse, sealhulgas diabeeti, vähkkasvajaid, Alzheimeri tõve, malaariat ja kõrgvererõhktõve. See on teinud PK-dest olulised ravimisihtmärgid. [6–8]



Inimese genoom sisaldab 518 PK kodeerivat geeni [2]. Katalüütilise domeeni sarnasuse alusel jaotatakse PK-d järgmistesse rühmadesse: türosiini kinaasid (TK); tsüklilised nukleotidi ja kaltsium-fosfolipiid-sõltuvad kinaasid, mis hõlmavad PKA, PKG ja PKC perekondi (AGC);  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmoduliin-sõltuvad kinaasid (CaMK); rühm, mis sisaldab CDK, MAPK, GCK ja CLK perekondi (CMGC); kaseiin kinaas 1 ja sellega seotud kinaasid (CK1); pärmi Sterile 7, Sterile 11 ja Sterile 20 kinaasid (STE); türosiinkinaaside sarnased kinaasid (TKL). Samasse rühma kuuluvatel PK-del on sarnased substraadi eriomasused ja reguleerimisviisid [2,9,10].

PK-sid jaotatakse fosforülitava aminohappejäägi alusel seriini/treoniini, türosiini ja kaksikspetsiifilisusega kinaasideks. Seriini/treoniini PK-sid saab jaotada substraadi eelistuste alusel kolme rühma: basofiilsed, proliinsuunatud ja atsidoofiilsed/fosforülsuunatud PK-d. Basofiilsed kinaasid eelistavad aluselisi ja hüdrofoobseid aminohappejääke. Sellesse rühma kuulub suurem osa AGC rühma PK-sid, CaMK rühma PK-d ja ka mitmed kinaasid, mis ei kuulu seitsmesse eelmainitud põhirühma [11]. AGC rühma kuuluvad PKA, PKB, PKC, PKG, MSK ja ROCK ja nende erinevad isovormid. Need kinaasid fosforülivad substraate, mis sisaldavad fosforülitava seriini/treoniini jäägi vahetus läheduses aluselisi aminohappeid (arginiini ja lüsiini) [12].

cAMP-sõltuv proteiinkinaas (PKA ehk cAPK) on enim uuritud PK, kuna on suhteliselt lihtsa struktuuriga ning seda on võimalik toota ja puhastada suuremates kogustes [13]. PKA koosneb kahest reguleerivast (PKAr) ja kahest katalüütilisest (PKAc) alaühikust, millest viimane on nn aktiivne alaühik ehk vastutav fosforüülimisreaktsioonide katalüüsist. Inimese organismis on kolm põhilist PKAc isovormi ( $\alpha$ ,  $\beta$  ja  $\gamma$ ), mis koosnevad 351 aminohappejäägist [14]. PKAc on 40 kDa suurune monomeerne valk, millel on nii ATP- kui ka valgu/peptiidi substraadi seondumistaskud. PKAc katalüüsitud fosforüülimisreaktsiooni käigus seostuvad mõlemad substraadid samal ajal katalüütilise piirkonnaga, mis põhjustab kolmikkompleksi moodustumise [15].

1996. aastal avastatud Rho kinaasid (ROCK-id) ROCK1 ja ROCK2 on üksteise isoensüümid [16]. Inimese ROCK1 (nimetatakse ka p160 ROCK või ROK $\beta$ ) [17] ja ROCK2 (ROK $\alpha$ ) [18] on valgud molekulmassiga ligikaudu 160 kDa ning koosnevad vastavalt 1354 ja 1388 aminohappejäägist. ROCK1 ja ROCK2 sisaldavad N-terminaalses osas seriini/treoniini kinaasi domeeni, sellele järgneb umbes 600 aminohappejäägist koosnev teisene heeliksi struktuur, plekstriini homoloogia domeen ja C-terminaalses osas Rho-valku siduv ala. Kahe ROCK-i isoensüümi aminohappeline järjestus on 65% ulatuses samasugune [16]. ROCK on oluline

ravimisihtmärk, olles seotud veresoonkonna haiguste, vähkkasvajate ja veel mitmete patoloogiliste seisunditega [19].

Mitogeen- ja stressaktiveeritud kinaasid (MSK-d) on sarnased ribosomaalsete valgu S6 kinaasidega (RSK) [20,21]. Inimese MSK1 (nimetatakse ka RSK-sarnane PK või RLPK) ja MSK2 (RSK-B) on 63% ulatuses identsed. Sarnaselt RSK-ga on MSK1 ja MSK2 kaks sõltumatut kinaasi domeeni samade polüpeptiididega [22]. MSK-d sisaldavad kahte kinaasi domeeni, ühte N-terminaalset kinaasi domeeni (NTKD) AGC kinaasi rühmast ja C-terminaalset domeeni (CTKD) CaMK rühmast [23]. MSK1 koosneb 802 ning MSK2 koosneb 772 aminohappejäägist. MSK kinaase seostatakse vähkkasvajate, krooniliste põletike, psoriaasi ning Huntingtoni tõvega [12].

## 2.2 Proteiinkinaaside inhibiitorid

Ensüümi inhibiitorid on molekulid, mis vähendavad ensüümiga seondudes nende aktiivsust. Kõik ensüümidega seonduvad molekulid pole inhibiitorid. Samuti võivad ensüümiga seonduda aktivaatorid, mis suurendavad ensümaatilist aktiivsust. [24]

PK-de katalüütilise taskuga seandumisel blokeerivad inhibiitorid nende katalüütilist toimet. Seega on PK-de aktiivsuse inhibeerimisel oluline terapeutiline roll. Neid saab kasutada vähkkasvajate ja teiste PK-dega seotud haiguste ravis. [15,25]

Esimene selektiivne PK inhibiitor Gleevec jõudis turule 2001. aastal. Gleevecit võib pidada esimeseks edukaks vähiravimiks, mis põhineb PK-de aktiivsuse reguleerimisel [6]. 2016. aasta seisuga oli FDA (Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Raviamet) heaks kiitnud 28 PK inhibiitori kasutamise ravimina [26].

Paljud selektiivsed PK-de inhibiitorid on mürgised, halvasti lahustuvad või muude farmakoloogiliste omadustega, mis takistavad nende kasutamist ravimitena. Sellised PK-de inhibiitorid võivad siiski olla olulised, kuna neid saab kasutada erinevates biokeemilistes ja biofüüsikalistes meetodites, et uurida ja iseloomustada PK-de aktiivsust, füsioloogilisi omadusi ja funktsioone. [6,27,28]

Põhiliselt arendatakse kolme erinevat tüüpi PK-de aktiivtasku inhibiitoreid. Esimesed neist on ATP-konkurentsed inhibiitorid [29]. ATP-konkurentsed inhibiitorid konkureerivad kõrge rakusisese ATP kontsentratsiooniga (üle 1 mM) ning eristama PK-de ATP-sidumistaskuid teistest valkudest, mis seovad samuti ATP-d. Lisaks 518 PK-le inimese genoomis on 1500 teist

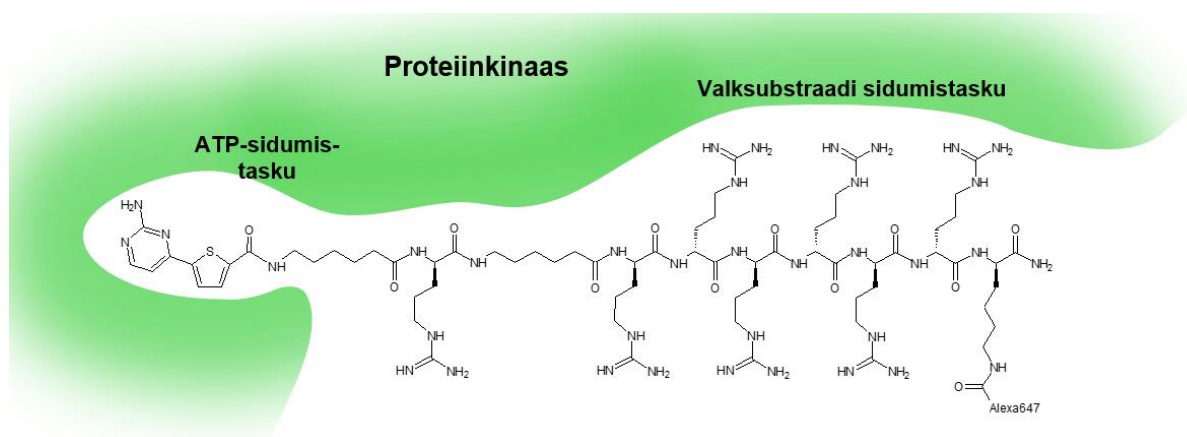
valku, mis on samuti võimalised siduma adeniini nukleotiide. Sellest hoolimata on suurem osa ravimiarenduses olevatest PK-de inhibiitoritest just ATP-konkurentsed [8,30,31].

Valksubstraat-konkurentsete inhibiitorite vastu on huvi ravimiarenduses olnud pigem tagasihoidlik nende suure molekulmassi, madala afiinsuse ja vähese võimega rakumembraani läbida. Valksubstraat-konkurentsed inhibiitorid häirivad selektiivselt valk-valk interaktsioone ja blokeerivad valksubstraadi seondumist kinaasi aktiivsentrile. Valk-valk interaktsioonide vaheline piirpind on keeruline sihtmärk ja hõlmab suuremat ja vähem määratletud ühenduspinda, võrreldes tavapäraste ravimi sihtmärkidega nagu ensüümi aktiivsentrleid ja ligandi seondumiskohad retseptoritel. [32,33]

Bisubstraatseid inhibiitoreid võib pidada kahe eelmainitu kombinatsiooniks, kuna seonduvad nii ATP- kui ka valksubstraati siduva domeeniga. Seda tüüpi inhibiitorid võivad saavutada hea selektiivsuse ja kõrge afiinsuse, kuid kõrge inhibeerimisvõime tekib vaid juhul, kui mõlemad aktiivsed osad seonduvad sihtmärk-valguga samaaegselt. [28,34]

### 2.2.1 ARC-tüüpi ühendid

Adenosiini analoogi ja oligo-arginiini konjugaadid (ARC-id) on Asko Uri grupis disainitud ja ühed põhjalikumalt uuritud PK-de inhibiitorid. ARC-id on kõrgafiinsed bisubstraatsed inhibiitorid, mis koosnevad nukleosiidi-sarnasest fragmendist, tavaliselt ATP-konkurentsest adenosiini derivaadist, ja peptiidsest osast, mis on omavahel seotud painduva linkeriga [28,35]. ARC-id on võimalised läbima rakumembraani, on stabiilsed rakusiseses keskkonnas ning füsioloogiliselt aktiivsed elusrakkudes ja -koes [28,36,37]. Kinaasiga seondumisel läheb ARC-i nukleosiidne fragment kinaasi ATP-taskusse ja peptiidne osa liitub valksubstraadi sidumistaskuga või piirkonnaga selle vahetus läheduses (Joonis 2) [35].



**Joonis 2.** ARC-1063 on bisubstraatne ühend, mis seondub mõlema PK sidumiskohaga üheaegselt ning on märgistatud fluorestentsvärviga Alexa 647 [38].

Kuigi ARC-tüüpi ühendid on kasutusel nii inhibiitoritena, saab neid samaaegselt kasutada ka sondidena. ARC-tüüpi bisubstraatsed ühendid seonduvad ainult aktiivse PK-ga ja seeläbi saab ARC-sondidega tuvastada PK aktiivsust (PK aktiivset osa kontsentratsiooni) proovis. Selle aspekti poolest erinevad ARC-sondid laialdaselt kasutatavatest valguseondumissondidest, fluorestsentsvärviga märgistatud PK antikehadest, mis reeglina ei erista aktiivset valgu struktuuri mitteaktiivsest [39,40].

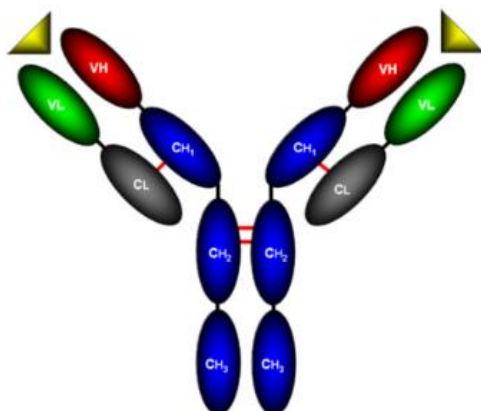
ARC-tüüpi sondid on kasulikud abivahendid teadustöös. Immobiliseeritult ehk pinnale sidestatult on neid võimalik kasutada PK-de eraldamisel ja puhastamisel afiinsuskromatograafias [41]. ARC-tüüpi inhibiitoreid saab edukalt kasutada pinnaplasmonresonants(PCR)-põhiste biosensorite konstrueerimiseks [42]. Fluorestsentsmärgisega ARC-tüüpi ühendeid on võimalik kasutada fluorestsentssondina sidumis- ja väljatõrjumiskatsetes PK-de (nt PKAc ja ROCK2) analüüsimisel [43]. ARC-tüüpi inhibiitoreid ja sonde saab edukalt kasutada ka rakukatsetes [44].

## 2.3 Antikehad

Antikehad ehk immunoglobuliinid (Ig-d) on glükoproteiinid, mida lümfotsüüdid (B-rakud) hakkavad tootma võõraste ainete ehk antigeenide sattumisel organismi. Oletatakse, et inimese organism võib toota kuni  $10^{13}$  erinevat antikeha. Antikehad seonduvad antigeenidega, et märkida need eemaldamiseks ja ja sellega kaitsta organismi [45–47]. Antikehad saavad seostuda paljude ainetega, näiteks valkudega bakteri raku pinnal [48]. Antikehade selektiivsus ja kõrge afiinsus antigeenide suhtes teeb neist suurepäraseid biotuvastuselemente [49].

Antikeha struktuur sisaldab kahte identset paari polüpeptiidi ahelaid (Joonis 3). Mõlemad paarid sisaldavad rasket (H) ahelat (~55 kDa) ja kerget (L) ahelat (~25 kDa), mis on omavahel ühendatud disulfiidsildadega. Ahelatel on nii konstantsed (C) kui ka varieeruvad (V) regioonid. Raskel ahelal on üks muutuv regioon (VH) ja kolm konstantset regiooni (CH1, CH2 ja CH3). Kergel ahelal on üks muutuv regioon (VL) ja üks konstantne regioon (CL). Nii raskete kui ka kergete ahelate N-terminaalsed otsad (VL ja VH) vahendavad antigeeni seondumist antigeeni spetsiifilise regiooniga, mida nimetatakse epitoobiks. VL ja VH domeenid toovad kokku hüpervarieeruvad antikeha domeenid, mida tuntakse komplementaarsust määrava regioonina (CDR). Ahelate C-terminaalsed otsad on konstantsed ning üldjuhul on samasugused, kuid nende aminohappeline järjestus varieerub erinevate Ig klasside puhul. Just CDR-i järjestuse ja struktuuri mitmekesisus määravad põhiliselt antigeenide spetsiifilisuse ja kõrge afiinsuse.

CDR-de puhul on järjestuse mitmekesisus suur, kuna koosnevad viiest kuni kümnest aminohappest. [46,49–52]



**Joonis 3.** Tüüpilise IgG antikeha molekuli struktuur. IgG molekulmass on ~150 kDa. Antigeeni seondumiskohad on märgitud kolmnurkadega ja disulfiidsillad on tähistatud punaste joontega [49].

Imetajate Ig-d jaotatakse nende raskete ahelate alusel viide klassi: IgA, IgG, IgM, IgD ja IgE. Igale klassile on omased erinevad funktsioonid, struktuur ja bioloogiline aktiivsus. IgG ja IgA on jaotatud vastavalt nelja ja kahte alamklassi. Valdav osa keha poolt toodetavatest antikehadest kuuluvad IgG klassi. IgG on kõige stabiilsem ja selle poolestusaeg on kuni 20 päeva. [45,50,51]

## 2.4 ELISA

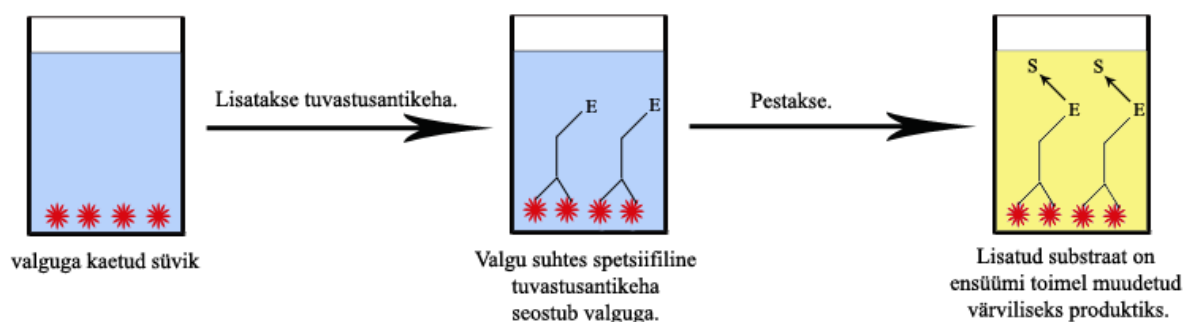
Immunoensüümmeetod (ELISA) on kvantitatiivne heterogeenne immunomeetod, mida kasutatakse erinevate sihtmärkide tuvastamiseks ja kontsentratsiooni määramiseks bioloogilistes vedelikes. ELISA arendati 1971. aastal radioimmuunmeetodist (RIA), milles kasutatav radioaktiivne jood-125 asendati ensüümidega [53–56]. Võrreldes RIA meetodiga on ELISA praktilisem, kuna puudub vajadus uurida kahte seerumi proovi. ELISA meetod on väiksema usaldusväärsusega, kuid peaaegu sama tundlik ega vaja spetsiaalset varustust ja radioaktiivset märgistust [57].

ELISA meetod on leidnud erinevaid rakendusalasid ja saanud tavapäraseks meetodiks teadustöös ning diagnostikalaborites tänu oma lihtsusele ja kasutamiskiirusele. ELISA abil saab diagnoosida ja jälgida erinevate haiguste kulgu, sealhulgas diagnoosida hepatiiti, analüüsida parasiite, määrata kasvajate markereid ja hormoonide hulka. [54,55,58,59]

ELISA meetod koosseb mitmest erinevast etapist. Ainete struktuurid ja mõõdetavad omadused pole alati samad, seetõttu on arendatud mitmekesine valik ELISA tüüpe, et suurendada

mõõtmise spetsiifilisust [53]. Esimesena arendatud otsene ELISA rajas tee teistele ELISA tüüpidele, mida rakendati esmalt IgG antikeha sisalduse määramiseks küüliku seerumis [54].

Otseses ELISA meetodis (Joonis 4.) lisatakse kõrge sidumisvõimega mikroplaadi süvendisse uuritav proov, mis sisaldab erinevaid valke. Valgu molekulid seonduvad mikroplaadi pinnale. Seejärel blokeeritakse vabaks jäänud sidumiskohad näiteks BSA-ga (veise seerumi albumiiniga), et ära hoida tuvastusantikeha mittespetsiifilist sidumist ja sellest tulenevat valepositiivse signaali kasvu. Pärast blokeerimisetappi lisatakse tuvastusantikeha, mille küljes on ensüüm (ensüümkonjugeeritud antikeha). Ensüümid on vajalikud, et substraadist katalüüsida värviline produkt, mida saab mõõta neeldumise või fluorestsentsi teel. Enim kasutatavad ensüümid ELISA meetodis on  $\beta$ -galaktosidaas, glükoosi oksüdaas, peroksidaas ja aluseline fosfataas. Tuvastusantikeha seondub spetsiifiliselt ehk ainult huvipakkuva valguga, seondumata jäänud ained eemaldatakse pesuetappidega. Pärast tuvastusantikeha lisatakse värvitu substraat, mis katalüüsitakse ensüümi poolt produktiks, mis neelab nähtava valguse lainepikkuste vahemikus. Positiivse tulemuse korral toimub värvimuutus, selle puudumine viitab aga negatiivsele tulemusele. Seejärel reaktsiooni peatatakse (näiteks HCl lahusega) ja määratakse spektrofotomeetriga kvantitatiivselt valgu hulk proovis. Mida suurem on värvi intensiivsus, seda rohkem huvipakkuvat valku on proovis. [54–56,59]



**Joonis 4.** Otsese ELISA lihtsustatud skeem, kus huvipakkuv valk tuvastatakse ensüümkonjugeeritud antikehaga. Ensüümi abil muudetakse substraat värviliseks produktiks.

Inspireerituna otsesest ELISA meetodist arendati 1978. aastal kaudne ELISA meetod, mis on parema tundlikkusega. Esmalt mõõdeti selle abil sea IgG antikeha hulka. Erinevalt otsesest ELISA meetodist kasutakse kaudses ELISA meetodis kaht antikeha. Huvipakkuva valguga seondub esmalt primaarne antikeha ning selle tunneb omakorda ära ensüümkonjugeeritud sekundaarne tuvastusantikeha. Seda meetodit kutsutakse kaudseks, kuna mõõdetavat analüüti ei määra primaarne antikeha, vaid kandjale asetatud sekundaarne tuvastusantikeha. [55,60]

Võileib- ehk kihilise ELISA kontseptsioon on võrreldes otsese ja kaudse ELISA meetoditega sama, kuid erinevalt eelnevatest lisatakse enne proovi mikroplaadi süvendisse püüdurantikeha. Huvipakkuv valk kinnitub püüdurantikeha ja tuvastusantikeha vahele. Sellest tuleb ka nimetus „võileib“. Võileib-ELISA on kaks kuni viis korda tundlikum kui teised ELISA meetodid. [55,61]

Konkurentne ELISA on võrreldes teiste ELISA tüüpidega unikaalne. Kui eelnevates tüüpides lisatakse antikehad, proov ja reagentid eraldi ja kindlas järjekorras, siis konkrentses ELISA meetodis lisatakse uuritav proov ja ensüümkonjugeeritud huvipakkuva valguga lahus samal ajal. See segu lisatakse ELISA plaadi kaevukesse pärast püüdurantikeha. Huvipakkuv valk hakkab konkureerima ensüümkonjugeeritud valguga, mõlemad üritavad piiratud hulga püüdurantikehaga seonduda. Antikeha molekuliga seondunud ensüümkonjugeeritud valgud tekitavad substraadi lisamisel värvimuutuse. Mida rohkem on proovis ensüümkonjugeeritud valguga konkurentset valku, seda väiksem on mõõdetav signaal. Erinevalt teistest ELISA tüüpidest on toodetava värvi intensiivsus ja analüüdi kontsentratsioon omavahel pöördvõrdelises seoses. [55,62]

## 2.5 SPR

Pinnaplasmonresonants (SPR) on 1990. aastal kasutusele võetud universaalne ja mitmekülgne meetod biomolekulide interaktsioonide iseloomustamiseks [63]. Interaktsioonipartneriteks võivad olla nii retseptor–ligand, ensüüm–substraat kui ka valk–peptiid [64,65]. SPR tehnoloogiat kasutatakse laialdaselt uute ravimikandidaatide väljaselgitamiseks, DNA hübridisatsiooni mõõtmiseks, antikehade iseloomustamiseks, epitoopide kaardistamiseks ja valkude erinevate konformatsioonide tundmaõppimiseks [64].

SPR tehnoloogia kasutab ära pinnaplasmoneid, erilisi elektromagnetilisi laineid, mida saab ergastada kindla metalli pinnal [66]. Tavaliselt on selleks metalliks kuld või hõbe [64]. SPR meetodis immobiliseeritakse üks interaktsiooni komponent (ligand) sensori kiibile ja teine osavõtja (analüüt) süstitakse pidevas voolus üle pinna [65,67]. Valgus suunatakse kindla nurga all vastu metalli pinda ning sõltuvalt molekulaarse kihi paksusest metalli pinnal põhjustab SPR nähtus peegeldunud valguse intensiivsuse astmelise vähenemise [64]. See võimaldab koguda andmeid interaktsiooni kohta refraktsiooniindeksi muutuse põhjal [66]. SPR vastust mõõdetakse refraktsiooni ühikutes (RU), mis on proportsionaalne pinnale kogunenud aine

massiga. Analüüsi tundlikkus sõltub seega molekulmassist ja erineb vähesel määral erinevat tüüpi ühendite korral [68].

SPR tehnoloogial on mitmeid eeliseid fluorestsentsmeetodite ja ELISA ees. Esiteks, ligandi pole vaja fluorestsentsvärviga märgistada, kuna vaadatakse murdumisnäitaja muutust. Teiseks on analüüs otsene, vajamata mitmeastmelist tuvastusprotokolli. Kolmandaks saab seostumisprotsessi jälgida reaalselt. See võimaldab lisaks kineetiliste andmete kogumisele uurida ka interaktsioonide termodünaamikat ja mehhanisme [66,69–71]. SPR tehnoloogia puuduseks on kasutatavate sensorkiipide kõrge hind. Neid on keeruline ka taaskasutada, kuna nende mahtuvus on piiratud ning ligandi või valgu immobiliseerimine nõuab täpset ja tihtipeale keerukat keemilist sidestamist [64].

## 2.6 Pinnad

Immobiliseerimiseks nimetatakse molekulide kinnitamist pinnale, mille tulemusel väheneb või kaob molekulide liikuvus. Valkude immobiliseerimise viis määrab suuresti meetodi rakendusvõimalused. Mõningatel juhtudel võib immobiliseerimine põhjustada osalist või täielikku valgu aktiivsuse kadu juhusliku orientatsiooni või struktuuri deformatsiooni tõttu. Bioloogilise aktiivsuse täielikuks säilitamiseks tuleks valgu molekulid kinnitada pinnale nii, et see ei mõjutaks molekuli konformatsiooni ja funktsiooni. Sobiv immobiliseerimise viis valitakse pinna ja valgu füsikokeemiliste ning keemiliste omaduste põhjal. Põhilised immobiliseerimistehnikad põhinevad füüsikalisel, kovalentsel või bioafiinsel immobiliseerimisel. Igal tehnikal on omad eelised, mistõttu immobiliseerimise strateegia valitakse vastavalt eesmärgile. Immobiliseerimise strateegiate üldistamine ühest süsteemist teise väga erinevate klasside jaoks on keeruline ja enamjaolt ebaõnnestunud paljude erinevate tunnuste ja funktsionaalsete valkude omaduste tõttu. [72]

Füüsikalisel immobiliseerimisel võivad valgud pindadele adsorbeeruda molekuliväliste jõudude kaudu, ioonsete sidemete ning hüdrofoobsete ja polaarsete interaktsioonide abil. Adsorptsiooni kaudu valmistatud pind on heterogeenne ja juhuslikult orienteeritud, kuna iga molekul võib moodustada palju sidemeid erinevates suundades, et vähendada tõukuvaid vastastiktoimeid substraadi ja eelnevalt adsorbeeritud valkude vahel. [72]

Sagedamini seotakse valgud kovalentselt aminohapete funktsionaalrühmade kaudu. Kovalentsed sidemed moodustuvad enamasti valgu kõrvalahela ja pinnal asuva funktsionaalrühma vahel, mis põhjustavad pöördumatu seondumise ja enamasti kõrge pinna katvuse. Ühtlase pinna saamiseks töödeldakse pindu põhjalikult ja funktsionaalsed rühmad



lisatakse keemilise töötlemisega. Tabel 1 näitab immobiliseerimise jaoks vajalikke valkudes olevaid funktsionaalrühmi ja antud pinna funktsionaalsust. [72]

**Tabel 1.** Funktsionaalrühmad valkudes ning nendega interakteeruvad pinnad [72].

| <b>Funktsionaalrühm</b> | <b>Aminohappejääk</b> | <b>Pind</b>          |
|-------------------------|-----------------------|----------------------|
| -NH <sub>2</sub>        | Lys, hüdroksüül-Lys   | karboksüülhape       |
|                         |                       | aktiivne ester (NHS) |
|                         |                       | epoksü               |
|                         |                       | aldehüüd             |
| -SH                     | Cys                   | maleimiid            |
|                         |                       | püridüüldisulfiid    |
|                         |                       | vinüülsulfoon        |
| -COOH                   | Asp, Glu              | amiin                |
| -OH                     | Ser, Thr              | epoksü               |

Keemiline seondumine aminohapete külghelate kaudu on tihti juhuslik. Kovalentne side võib toimuda samal ajal paljude jääkidega, suurendades heterogeensust immobiliseeritud valkude kogumis. Keemilist kinnitumist saab suunata ka korrapäraselt, et saavutada suunatud immobiliseerimine. [73]

Biokeemilised afiinsusreaktsioonid pakuvad suunatud valkude immobiliseerimist, mis võib anda eelise teiste immobiliseerimistehnikate ees. Enamasti on võimalik sama pinda korduvalt kasutada, mis vähendab reagentide ja pinna valmistamise kulusid. [72]

### 3 Eksperimentaalne osa

Töö eesmärgiks oli arendada uudne meetod PK aktiivse hulga määramiseks, mis põhineb pinnale adsorbeeritud proovi analüüsimisel. Uuritav meetod sarnaneb oma olemuse, idee ja katsetappide poolest ELISA meetodiga, kuid sellel on mitmeid erinevusi. Proov kantakse pinnale spottidena, mis suurendab meetodi tundlikkust [74]. Spot on umbes 100 nl suurune pinnale tekitatud lahusetäpp ning spoti tekitamist nimetatakse spottimiseks. Spottimise puhul kulub ainet minimaalselt ning mikroplaati süvendi pinnale on võimalik lisada mitu erinevat valgulahust. Blokeeritud pinnale lisatakse fluorestsentsvärviga tuvastusreagent (antikeha või ARC-sond), seejärel süvendid pestakse ning määratakse PK aktiivsus fluorestsentskanneriga mõõdetud intensiivsuse alusel.

#### 3.1 Kasutatud seadmed ja abivahendid

ARC-ide ning kinaaside spektrite mõõtmiseks kasutati UV-Vis spektrofotomeetrit NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) mõõtevahemikuga 190...840 nm. Kasutati neelduvuskoeffitsiente  $\epsilon_{647\text{ nm}}$ (ARC-1063; ARC-3117) = 250000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Spektrite mõõtmiseks kasutatud lahuse ruumala oli 1 µl. Kontsentratsioonid arvutati vastavalt Lambert-Beer'i seadusele valemiga  $A = \epsilon Cl$ , kus  $A$  – lahuse optiline tihedus,  $\epsilon$  – aine molaarne neeldumiskoeffitsient lainepikkusel  $\lambda$ ,  $C$  – lahuse kontsentratsioon,  $l$  – lahusekihi optiline teepikkus sentrimeetrites (kasutatud  $l = 0,1$  cm).

Lahuste valmistamiseks kasutati raputit Vortex V-1 plus (Biosan) ning tsentrifuugi C1301 (Labnet). Ainete kaalumiseks kasutati analüütilist kaalu XP205 (Mettler Toledo). Inkubeerimiseks kasutati loksut-termostaati DTS-4 (Elmi). Lahuste valmistamiseks ja mikroplaadile kandmiseks kasutati manuaalpipette Eppendorf Research (Eppendorf).

Katsetes kasutati kahte klaaspõhjaga 96 süvendiga mikroplaati: polü-D-lüsiini (PDL) plaati (Greiner) ning SuperAmine plaati (ArrayIt (Joonis 5)).



**Joonis 5.** SuperAmine (ArrayIt) plaat. Foto: Alla Troska.

Pinnale kantud tuvastusreagendi intensiivsuse mõõtmiseks kasutati fluorestsentskannerit Odyssey CLx-0150 (Li-Cor).

Tulemusi analüüsi programme Image Studio 2.0 (Li-Cor), GraphPad Prism 5.04 (Graphpad Software), Excel 2016 (Microsoft Corporation), ImageJ 1.48 (Java).

### 3.2 Kasutatud ained

Puhvrite valmistamiseks kasutati seadmega Millipore Simplicity 185 (Millipore GmbH) toodetud MilliQ vett eritakistusega  $18,2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$  ja orgaaniliste lisanditega  $<6$  osakest miljardikust (ppb).

Katsetes kasutatud reaktiivid: BSA, HEPES, Tween 20, NaCl (Sigma-Aldrich),  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Kebo AB). Vedellämmastik (AGA).

Kasutatud antikehad: IgG(PKAc)-AF647 (antikeha saadud koostöös Kinasera OÜ-ga), IgG(PKA $\alpha$ c) (Santa Cruz Biotech), Pim2-4730-DOL5 (antikeha saadud koostöös Kinasera OÜ-ga).

Mõlemad kasutatud ARC-tüüpi sondid (ARC-1063, ARC-3117) on sünteesitud Tartu Ülikoolis Asko Uri uurimisrühmas (Lisa 10.)

Kasutatud fluorestsentsvärvid: PF647 (PromoKine), AF647 (Invitrogen Company).

Kasutatud proteiinkinaasid: PKAc (Biaffin GmbH & Co KG); PKAc-PF647 (tootnud ja keemiliselt värvunud Taavi Ivan, The Norwegian Structural Biology Centre, Department of Chemistry, Tromsø Ülikool); Pim2 (tootnud Katrin Kestav, Nuffield Department of Clinical Medicine, Oxfordi Ülikool); His-PKAc-His (tootnud Ganesh babu Manoharan, Keemia instituut, Tartu Ülikool); ROCK2 (Carna Biosciences); MSK1 (Millipore).

### 3.3 Meetodi optimeerimine

#### 3.3.1 Mikroplaadi valik spottimiskatseteks

Värvilisest antikehast IgG(PKAc)-AF647 valmistati 2-kordne lahjendusseeria  $11,8 \mu\text{M}$  kuni  $1 \text{ nM}$ . Spotid kanti pinnale ruumalaga  $100 \text{ nl}$ . Plaate võrdlevatest katsetest saadud intensiivsuste mõõtmisest arvutati avastamispää valemiga  $\text{LoD} = 3,3 \times (\text{tühiproovi standardhälve/sirge tõus})$  ning määramispää valemiga  $\text{LoQ} = 10 \times (\text{tühiproovi standardhälve/sirge tõus})$ .

### 3.3.2 SA plaadi sidumismaht

SA plaadi sidumismahu väljaselgitamiseks tehti antikehast IgG(PKAc)-AF647 kahekordne lahjendusseeria alustades kontsentratsioonist 11,8  $\mu\text{M}$  ja lõpetades kontsentratsiooniga 1,44 nM.

### 3.3.3 Spottimise tehnikate uurimine

Võrreldi kolme erinevat kinaasilahuse spoti tekitamise tehnikat ruumaladega vahemikus 100 kuni 400 nl. Kinaas tuvastati ARC-1063 sondiga. Esiteks katsetati tavalist pipeteerimist, kus võeti pipetiotsikusse sisse kindel ruumala lahust ning pipeteeriti see pinnale. Teise tehnikana kasutati pöördpipeteerimist (ingl *reverse pipetting*), kus esmalt võeti pipetiotsikusse lahust 1000 nl. Seejärel vähendati pipetil ruumala vastavalt 100 nl või 200 nl kaupa, mille tõttu pipetiotsikus tekkinud lisaõhk surus vastava ruumalaga lahuse otsikust välja. Pipetiotsiku pinnale asetamisel tekkis kindla ruumalaga spot. Kolmanda tehnikaga võeti pipetiotsikusse 200 nl lahust. Seejärel asetati pipetiotsik vastu pinda ning selles asuv lahus kandus spotina pinnale.

### 3.3.4 Spottipuhvri mõju

Sobiva spottimispuhvri väljaselgitamiseks valmistati värvilise antikeha IgG(PKAc)-AF647 236 nM lahused erinevates puhvrites. Neist neli valmistati 50 mM HEPES-puhvriga ja neli 50 mM fosfaatpuhvriga: 1) HEPES või  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ; 2) HEPES või  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ja 150 mM NaCl; 3) HEPES või  $\text{Na}_3\text{PO}_4$  ja 0,005% P20; 4) HEPES või  $\text{Na}_3\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl ja 0,005% P20. Kõikide puhvrite pH = 7,5.

### 3.3.5 Pesemispuhvri mõju antikeha-kinaasi kompleksile

Kõige sobivama pesemislahuse väljaselgitamiseks antikeha-kinaasi kompleksi säilimiseks pinnal katsetati nelja erinevat HEPES puhvrit ja nelja erinevat fosfaatpuhvrit (kirjeldatud peatükis 3.3.5). Selleks tehti pinnale HEPES puhvris või fosfaatpuhvris valmistatud 250 nM IgG(PKAc) spotid ning tuvastati 10 nM proteiinkinaasiga PKAc-PF647.

### 3.3.6 Pesemispuhvri mõju kinaasi-ARC-i kompleksile

Pesemispuhvri mõju hindamiseks kinaasi-ARC-i kompleksile kanti pinnale 600 nM PKAc spotid, mis tuvastati 10 nM ARC-1063 lahusega ning pesti vastavalt kaks korda HEPES-NaCl (edaspidi 2k) puhvriga või HEPES-NaCl-P20 (edaspidi 3k) puhvriga ning üks kord MQ-veega.

### 3.3.7 Lisapesude katsetamine ARC-1063:PKAc signaali intensiivsusele

Katsetati lisapesude vajalikkust pärast BSA lahuse eemaldamist. Selleks tehti pinnale 600 nM PKAc spotid. Pärast BSA lahuse eemaldamist katsetati kolme varianti: ilma lisapesuta, üks lisapesu või kaks lisapesu 3k puhvriga. PKAc tuvastati 10 nM ARC-1063-ga (Lisa 6).

### 3.3.8 Tuvastusreagendi puhverlahuse mõju kinaasi-ARC-i kompleksile

Katse läbiviimiseks tehti proteiinkinaasi PKAc spotid kontsentratsioonidega 600 nM, 200 nM, 67 nM ning tuvastati vastavalt HEPES-NaCl (2k) või HEPES-NaCl-P20 (3k) puhvris valmistatud 10 nM ARC-1063 lahusega.

### 3.3.9 Tuvastusreagendi kontsentratsioon

Antikeha ning ARC-i küllastuskontsentratsiooni leidmiseks kanti plaadi pinnale 400 nM proteiinkinaaside Pim2, PKAc ja His-PKAc-His spotid ning tuvastati kas antikehaga IgG(PKAc)-AF647 või sondiga ARC-1063 kontsentratsioonidel 1  $\mu$ M, 500 nM, 250 nM, 100 nM, 50 nM, 25 nM, 10 nM ja 2 nM. Sama katset korrati IgG(PKAc)-AF647 ja ARC-1063 kontsentratsioonidega 10 nM, 5 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM, 0,25 nM, 0,1 nM, 0,05 nM.

### 3.3.10 Kinaasi spottide kuivamise mõju

Kinaasi spottide kuivamisaja mõju määramiseks analüüsitulemustele tehti 600 nM proteiinkinaasi PKAc spotid ning lasti neil enne BSA-lahuse lisamist kuivada vastavalt 5, 10 või 15 minutit. Kinaasi spotid pinnal tuvastati 10 nM ARC-1063 lahusega (Lisa 1).

### 3.3.11 BSA lahuse inkubatsiooniaja mõju

BSA lahuse mõju hindamiseks ARC-1063:PKAc kompleksi säilumisele pinnal tehti 600 nM kinaasi PKAc spotid kontsentratsiooniga 600 nM ning enne ARC-1063-ga tuvastamist hoiti BSA 2% lahust peal vastavalt 5, 15 ja 30 minutit (Lisa 2).

### 3.3.12 Tuvastusreagendi inkubatsiooniaja mõju

Tuvastusreagendi inkubatsiooniaja mõju väljaselgitamiseks tehti pinnale 600 nM spotid, 10 nM tuvastuslahust ARC-1063 hoiti peal vastavalt 5, 15, 30 ning 60 minutit (Lisa 3).

### 3.3.13 Mõõtmistingimuste optimeerimine fluorestsentskanneril

Proteiinkinaasist PKAc tehti kahekordne lahjendusseeria (20  $\mu$ M kuni 0,3  $\mu$ M) ning tuvastati 10 nM ARC-1063 lahusega. Mõõtmisel fluorestsentskanneriga katsetati intensiivsuseid erinevaid (Lisa 4).

Parima mõõtmisügavuse väljaselgitamiseks tehti pinnale kinaasi PKAc 600 nM spotid, mis tuvastati 10 nM ARC-1063-ga. Mõõtmisel katsetati sügavusi 0,0 mm; 0,5 mm; 1,0 mm; 1,5 mm; 2,0 mm; 2,5 mm; 3,0 mm; 3,5 mm ja 4,0 mm (Lisa 5).

### 3.4 Proteiinkinaaside aktiivse kontsentratsiooni määramine

Proteiinkinaaside PKAc, ROCK2 ning MSK1 aktiivse hulga määramisel kasutati optimeerimiskatsetes selgunud tingimusi. Kinaasist tehti kahekordne lahjendusseeria ning tuvastati 10 nM ARC-1063-ga. Kinaasist PKAc tehti lahjendusseeria alates 20  $\mu$ M kuni 0,04 nM, ROCK2-st 1  $\mu$ M kuni 0,48 nM, MSK1-st 2  $\mu$ M kuni 0,97 nM.

### 3.5 Antikeha/ARC-i ja kinaasi kompleksi tuvastamine

Pinnale tehti 400 nM kinaaside PKAc ning Pim2 spotid ning tuvastati 11,8  $\mu$ M antikehadega IgG(PKAc)-AF647; 31,8 nM Pim2-4730-DOL5-ga ning 15 nM ARC-1063-ga, 15 nM ARC-3117-ga (Lisa 7 ja Lisa 8).

### 3.6 Kinaasi lahjendusseeria ning tuvastamine antikehaga

Pinnale tehti kinaasi PKAc kahekordse lahjendusseeria 2  $\mu$ M kuni 0,06 nM spotid. Üks seeria tuvastati 10 nM ARC-1063-ga ning teine 10 nM IgG(PKAc)-AF647-ga.

### 3.7 Antikeha selektiivsuse katse

Katse sooritamiseks kasutati 400 nM aktiivset PKAc kinaasi, millest osa denatureeriti vedellämmastikuga, hoides kinaasiga katsetuubi ~10 sekundit vedelas lämmastikus ning siis 3 minutit 70 °C juures, samal moel toimiti viis korda. Aktiivne ja denatureeritud kinaas segati omavahel erinevates vahekordades:  $\frac{3}{4}$  aktiivne ja  $\frac{1}{4}$  denatureeritud PKAc,  $\frac{1}{2}$  aktiivne +  $\frac{1}{2}$  denatureeritud PKAc,  $\frac{3}{4}$  denatureeritud ja  $\frac{1}{4}$  aktiivne PKAc. Kaevukestesse tehti eelmainitud vahekordades kinaasi spotid ning lisaks ainult aktiivne PKAc ning denatureeritud PKAc. Kinaas tuvastati 25 nM mAb(PKAc)-AF647-ga.

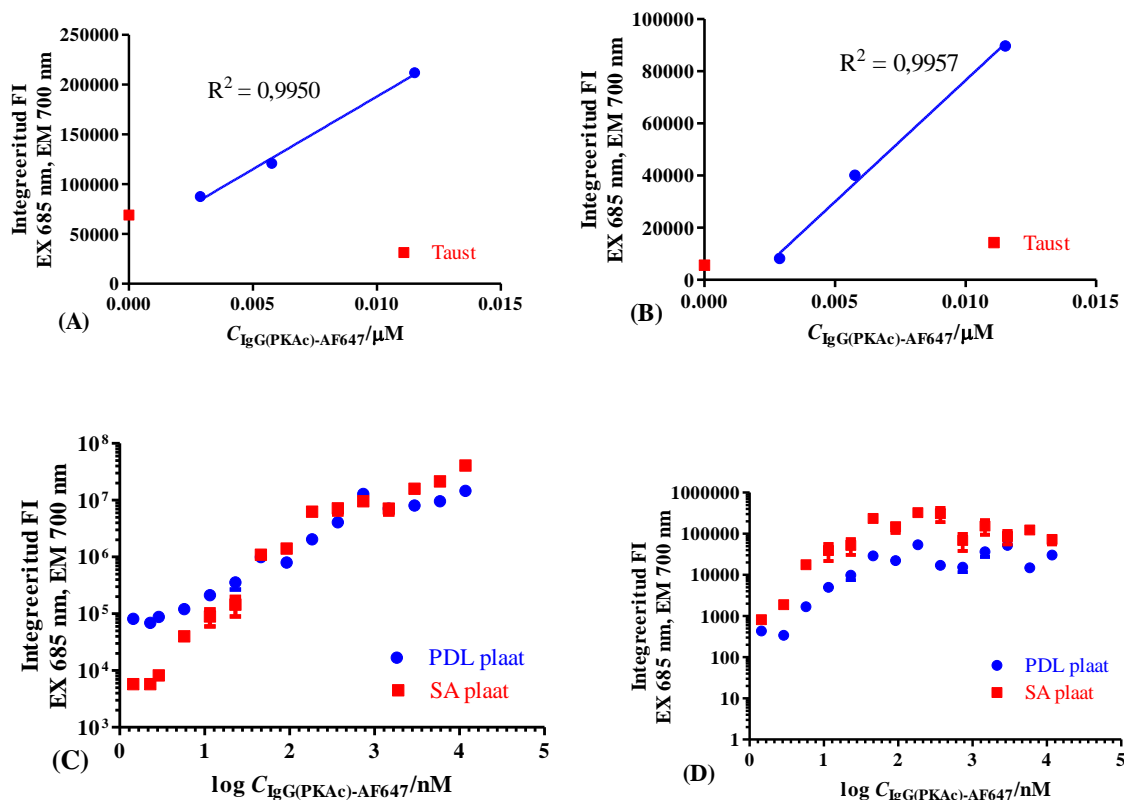
## 4 Tulemused ja arutelu

PK-de ebatavalise aktiivsuse kiire ja mugav määramine võimaldaks mitmete haiguste varajast diagnoosimist. Antud töös arendati välja meetod PK aktiivse hulga määramiseks, mis põhineb pinnale adsorbeeritud PK analüüsimisel antikeha või madalmolekulaarsete ARC sondidega.

Meetodit optimeeriti arvukate katsete raames. Esmalt võrreldi kahte erineva pinnaga mikroplaati, et uurida nende sobilikkust katsete jätkamiseks. Jälgiti blokeerimise, erinevate puhvrite ja puhvrikomponentide mõju signaalile erinevates katsetappides ning millised tuvastusreagendi kontsentratsioonid on optimaalsed pinnale seostunud kinaasi tuvastamiseks. Lisaks tehti mitmeid ajakatseid ning katsetati erinevaid tingimusi fluorestsentskanneril.

### 4.1 Mikroplaadi valik spottimiskatseteks

Meetodi rakendatavust uuriti kahe erineva pinnakeemiaga kõrge sidumisvõimega plaadil: polü-D-lüsiini (PDL) ja SuperAmine (SA). PDL plaadi pind on funktsionaliseeritud polümeriseeritud lüsiinijääkidega ning SA pind aminorühmadega (täpne pinnakeemia on avaldamata). Selleks viidi pinnale keemiliselt värvitud antikeha lahjendusseeria, töödeldud pinda mõõdeti fluorestsentskaneerijaga ( $\text{signaal} = \text{absoluutne signaal} - \text{taust} \times \text{pindala}$ ) ja tulemustest leiti väikseim tuvastatav antikeha kontsentratsioon: PDL plaadi LoD = 0,21 nM (Joonis 6A) ja SA plaadi LoD = 0,04 nM (Joonis 6B). SA pind on selle katse põhjal ligikaudu viis korda parema tuvastuspiiriga kui PDL pind. SA plaati iseloomustas oluliselt madalam taustsignaal võrreldes PDL plaadiga. 11,8  $\mu\text{M}$  antikeha spoti intensiivsus SA plaadil ( $4,0 \times 10^7$ ) oli kaks korda suurem kui PDL plaadil ( $2,0 \times 10^7$ ). Maksimaalse signaali jagamisel tausta intensiivsusega saadi PDL plaadi puhul tulemuseks 218 ning SA plaadi korral saadi 36 korda parem tulemus – 7892 (Joonis 6C). Kahe erineva plaadi kontsentratsiooniseeria signaal-müra suhete võrdluses andis SA plaat kaks kuni 10 korda parema tulemuse (Joonis 6D). Nende tulemuste põhjal otsustati edasisi katseid jätkata SA plaadiga.



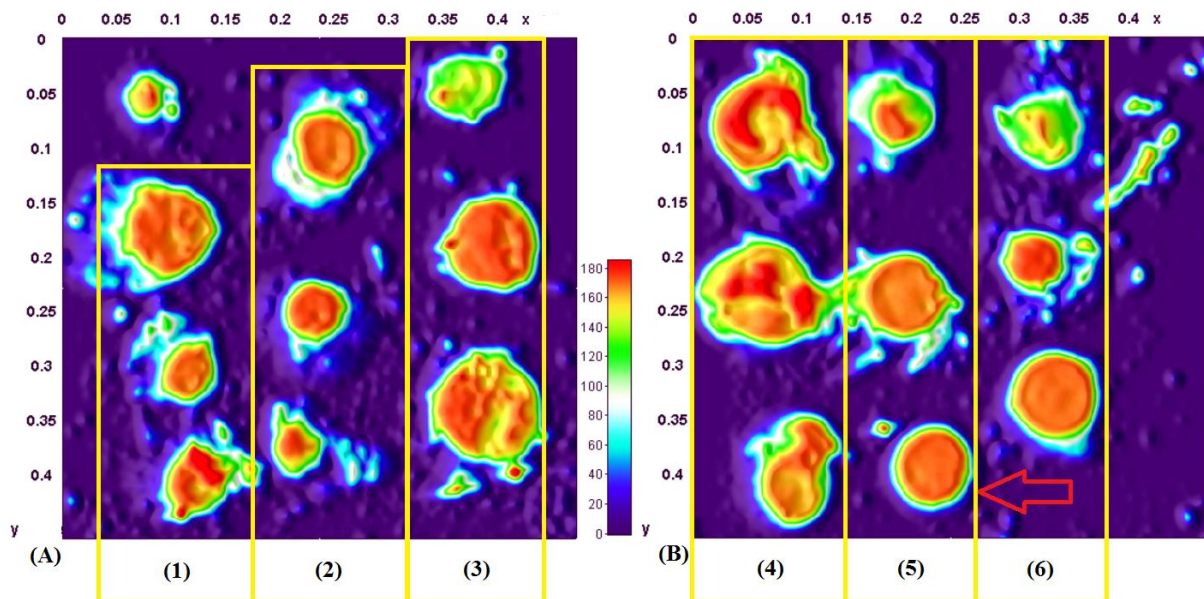
**Joonis 6.** PDL ja SA plaatide võrdlus spotitud IgG(PKAc)-AF647 kontsentratsiooniseeria põhjal. Madalate kontsentratsioonide signaal PDL plaadil (A) ja SA plaadil (B). Kontsentratsiooniseeria intensiivsused (C) ja signaal-müra suhe (D).

#### 4.1 Spottimise tehnikad

Nanoliitrites ruumala on keeruline pipetiga võtta ning samuti ühtlaselt süvendisse pipeteerida. Ühtlase kuju ja sarnase suurusega spottide saamiseks katsetati erinevaid spoti tekitamise tehnikaid ning ruumalasid. Spottimise tehnikate võrdluse eesmärk oli leida kõige usaldusväärsem proovide pinnale kandmise viis. Kuna spottimine viiakse läbi käsitsi, on tegemist etapiga, mis põhjustab meetodis suure määramatuse allika. Proovide automaatpipeteerimine on kulukas ja mõistlik pärast meetodi rakendatavuse kinnitamist.

Pöördpipeteerimine 100 nl (Joonis 7B, ala 5) ruumalaga andis võrreldes tavalise pipeteerimise (Joonis 7A, alad 1 kuni 3) ja pinnakontakti teostatud (Joonis 7B, ala 6) spottimisega kõige ühtlasema spottide morfoloogia ja signaali intensiivsuse.



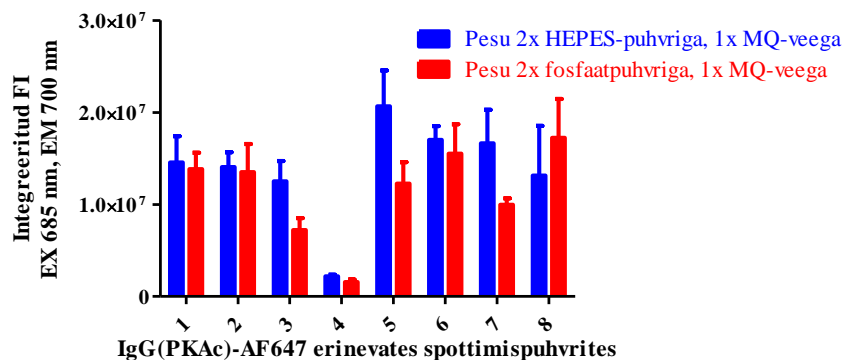


**Joonis 7.** Erinevate tehnikatega saadud spotid. Alad 1 kuni 3 – tavaline pipeteerimine ruumaladega vastavalt 200 nl, 300 nl ja 400 nl. Alad 4 ja 5 – pöördpipeteerimine ruumaladega vastavalt 200 nl ja 100 nl. 6 – spoti tekitamine pipetiotsiku pinnaga kontakti viimisel ruumalaga 200 nl. Nool osutab pöördpipeteerimisega tekitatud ühtlase morfoloogiaga spotile.

#### 4.2 Spottimispuhvri mõju

Valkude analüüs mikroplaatide ja -kiipide pinnal on tihtipeale väga tundlik erinevate puhvrikomponentide suhtes. Igas katseetapis on erinevate puhvri komponentide mõju erisugune. Heade omadustega meetod on oma olemuselt lihtne ning eelistatult võimalikult vähe puhvritundlik. Parima puhvri ja puhvrikomponentide kombinatsiooni väljaselgitamiseks spottimis- ning pesemislahuste valmistamisel katsetati kaheksat erinevat puhverlahust.

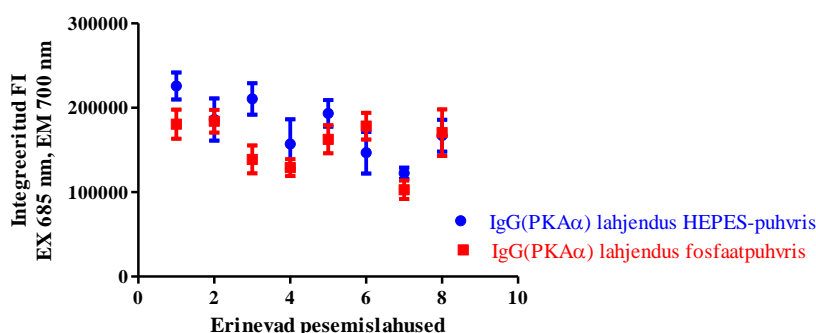
Proovide kandmisel pinnale võib lähtepuhver määrata analüüdi seostumist ja seetõttu mõjutada kvantifitseerimise tulemust. Spottimispuhvri katses uuriti IgG(PKAc)-AF647 pinnale kandmist erinevatest lähtepuhvritest (Joonis 8). Kõige suurem erinevus esines HEPES-P20 segu kasutamisel, mis andis väga madala signaali. P20 takistab antikeha ja tõenäoliselt teiste valkude seondumist pinnaga. Lahusesse lisatud sool andis paralleelspottide ühtlasema signaali. Saadud tulemused demonstreerivad spottimislahuse vähest tundlikkust puhvrikomponentide suhtes.



**Joonis 8.** IgG(PKAc)-AF647 lahused valmistatult kaheksas erinevas spottimislahuses: 1 – HEPES; 2 – HEPES-NaCl; 3 – HEPES-NaCl-P20; 4 – HEPES-P20; 5 – fosfaatpuhver; 6 – fosfaatpuhver-NaCl; 7 – fosfaatpuhver- NaCl-P20; 8 –fosfaatpuhver-P20. Pesulahus HEPES- (sinine) või fosfaatpuhver (punane).

#### 4.3 Pesemispuhvrite mõju

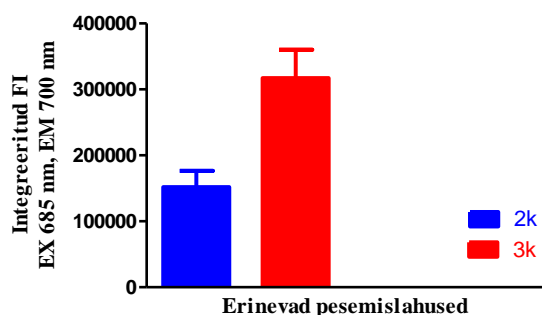
IgG(PKAc)-PF647 kompleksi säilumisele plaadi pinnal vaadeldi erinevate pesemispuhvrite mõju. Antikeha proov valmistati nii HEPES- kui fosfaatpuhvris (Joonis 9). Proovid kanti erinevate süvendite pinnale, pesti vastavaid puhvrikomponente sisaldavate lahustega ja mõõdeti nende intensiivsus. Proovide võrdluses esines statistiline erinevus vaid pesulahuse korral, mis sisaldas NaCl-P20 komponente ( $P = 0,016$ ). See on oluline, kuna valgute lahused sisaldavad enamasti stabilisaatoritena nii soola kui detergenti. Kuna HEPES puhver andis kõrgema signaali võrreldes fosfaatpuhvriga, eelistati HEPES puhvri kasutamist nii spottimisel kui pesemisel.



**Joonis 9.** Pesemislahuse komponentide mõju IgG(PKAc)-AF647 spottide signaalile: 1 – HEPES; 2 – HEPES-NaCl; 3 – HEPES-NaCl-P20; 4 – HEPES-P20; 5 – fosfaatpuhver; 6 –

fosfaatpuhver-NaCl; 7 –fosfaatpuhver-NaCl-P20; 8 – fosfaatpuhver-P20. PK lahjendus vastavalt HEPES- (sinine) või fosfaatpuhvril (punane).

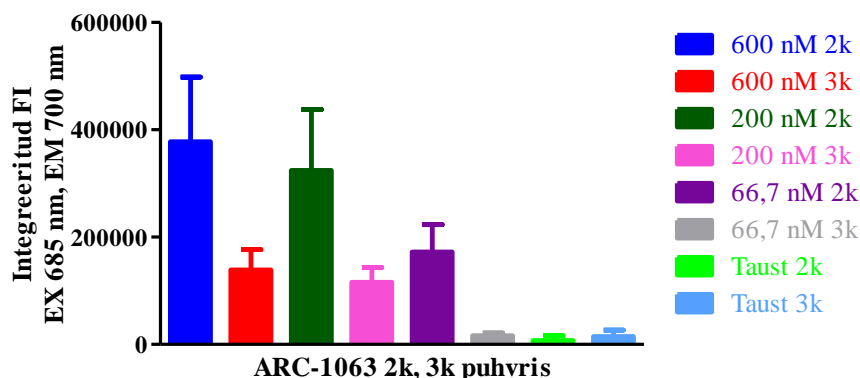
Eelnevatest katsetest valiti välja kaks sobivat puhverlahust pesemiseks: kahe- ning kolmekomponendiline HEPES-puhver ning katsetati neid ARC-sondi ja kinaasi vahelise kompleksi säilimisele pinnal. PKAc kanti lähtelahuses pinnale võrdse kontsentratsiooniga ja inkubeeriti 10 nM ARC-1063 lahuse juuresolekul. ARC-1063:PKAc kompleksi spotte pinnal pesti HEPES-NaCl (2k) ja HEPES-NaCl-P20 (3k) puhvriga. Spottide intensiivsus oli kõrgem ja mittespetsiifiline tausta signaal madalam juhul, kui pärast ARC-i lahuse eemaldamist pesti 3k puhvriga (Joonis 10). Edaspidi otsustati kasutada pesemiseks kolmekomponendilist (3k) puhvrit.



**Joonis 10.** ARC-1063:PKAc kompleksi spottide signaal pärast HEPES-NaCl (2k) ja HEPES-NaCl-P20 (3k) puhvriga pesemist.

#### 4.4 P20 mõju fluorestsentsi intensiivsusele ARC-sondi visualiseerimislahuses

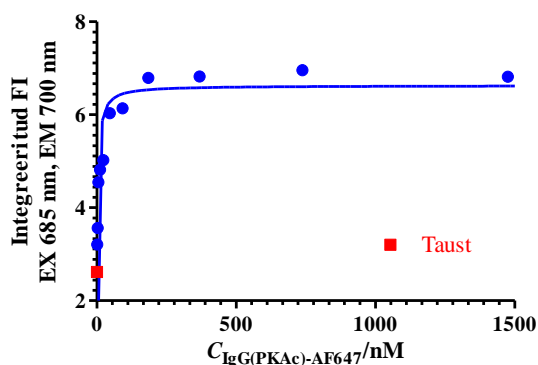
ARC-i lahuse valmistamiseks katsetati kahte erinevat puhvrit, mis andsid paremad tulemused ka spottmispuhvri valikul. ARC-sond (ARC-1063) on füüsikaliste omaduste poolest antikehaga võrreldes väga erinev. ARC-1063 on madalmolekulaarne ja hüdrofiilsete omadustega ning selle mittespetsiifiline adsorptsioon pinnale võib olla tugev. ARC-1063 (10 nM) lahuse valmistamisega ja PKAc spottidega pinnal inkubeerimisega 2k puhvril saavutati kolm kuni kümme korda kõrgem signaal võrreldes 3k lahusega. P20 vähendas oluliselt spetsiifilist signaali spotis ja seejuures põhjustas kõrgema tausta intensiivsuse (Joonis 11). Kinaaside visualiseerimiseks ARC-sondidega kasutati seetõttu 2k puhvrit.



**Joonis 11.** 2k puhvri (sinine) ja 3k puhvri (roheline) mõju ARC-1063:PKAc spottide signaalile.

#### 4.5 SA pinna sidumismaht

SA pind on monokiht, mille pindala kohta saab siduda kindel kogus valku (kui välja arvata valgumolekulide võimalikku sidumist üksteise peale). IgG(PKAc)-AF647 lahjendusseeria SA pinnal optimeeritud tingimustega näitas, et antikeha lahjenduste spottimisel saavutub platoo 180 nM kontsentratsiooni juures (Joonis 12). Lähendades valkude struktuuri globulaarsele kujule ja arvestades kinaaside väiksemalt molekulmassi võrreldes antikehadega võib oletada, et kinaasi lahuse kontsentratsioon on pinna küllastamiseks kuni kaks korda suurem.



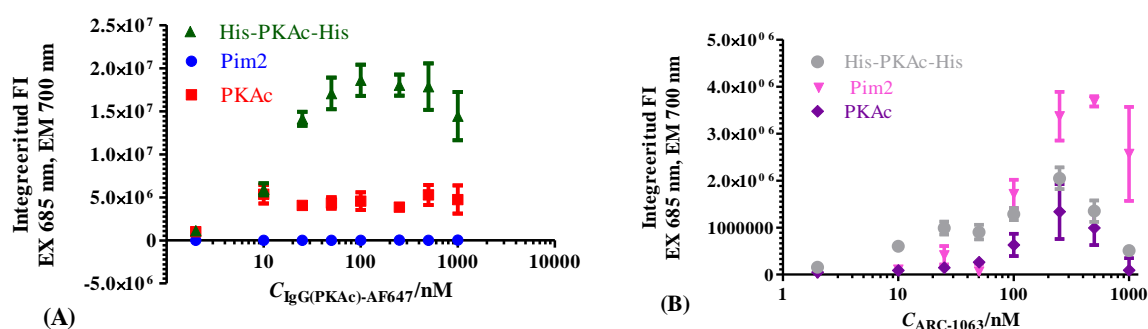
**Joonis 12.** Antikeha lahuse (100 nl) maksimaalse kontsentratsiooni leidmine pinna küllastamiseks.

#### 4.6 Tuvastusreagendi kontsentratsioon

Antikeha ja ARC-sondi sidumine pinnale kantud PK-le on loomu poolest erinev. Antikeha struktuuris on kaks üksteisest eraldatud antigeeni siduvat ala, mistõttu üks antikeha võib siduda korraga kahele PK molekulile või suuruse tõttu takistada ligipääsu külgnivatele adsorbeerunud PK molekulidele. Antikehad on enamasti toodetud kindlat peptiidijärjestust siduma ega taga

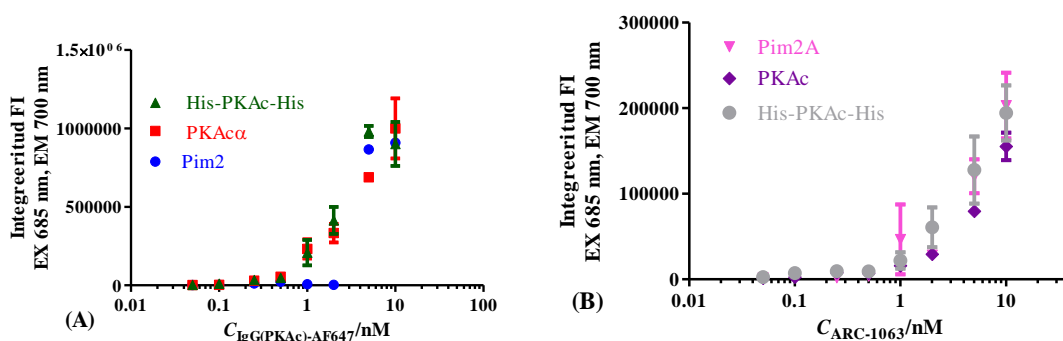
aktiivse ja inaktiivse PK selektiivsust. ARC-sond seondub vaid aktiivsele PK-le suhtes 1:1, kuid Ligipääs adsorbeerunud kinaasi aktiivtaskule võib olla pinna poolt takistatud.

Antud katses valmistati lahjendusseeriad tuvastusreagentidest IgG(PKAc)-AF647 ja ARC-1063 ning uuriti nende seondumist pinnale spotitud 400 nM His-PKAc-His, Pim2 ja PKAc-le. Tuvastusreagentide kõrgetel kontsentratsioonidel suurenes tausta intensiivsus tugevalt ja segas analüüsi. Maksimaalne IgG(PKAc)-AF647 signaal saavutus His-PKAc-His puhul 100 nM ja PKAc puhul 10 nM kontsentratsiooni juures, antikeha on selektiivne PKAc suhtes ja Pim2 signaal oli minimaalne (Joonis 13A). Kõigi PK-dega saavutas ARC-1063 maksimaalse intensiivsuse 250 nM juures, kuid intensiivsus oli märgatavalt madalam võrreldes IgG(PKAc)-AF647-ga (Joonis 13B).



**Joonis 13.** Tuvastusreagentide IgG(PKAc)AF647 (A) ning ARC-1063 (B) lahjendusseeriade (1000...2 nM) intensiivsused 400 nM vastava spotitud kinaasi korral.

Joonisel 13 kasutatud tuvastusreagentide kontsentratsioonide väga kõrgeid intensiivsusi ja reagentide kulu arvestades (100 µl) on mõistlik kasutada madalamaid kontsentratsioone. Samade kinaaside kontsentratsioonide juures uuriti tuvastusreagentide kontsentratsioonivahemikku 0,5...10 nM (Joonis 14).



**Joonis 14.** Tuvastusreagentide IgG(PKAc)AF647 (A) ning ARC-1063 (B) lahjendusseeriade (10...0,5 nM) intensiivsused 400 nM vastava spotitud kinaasi korral.

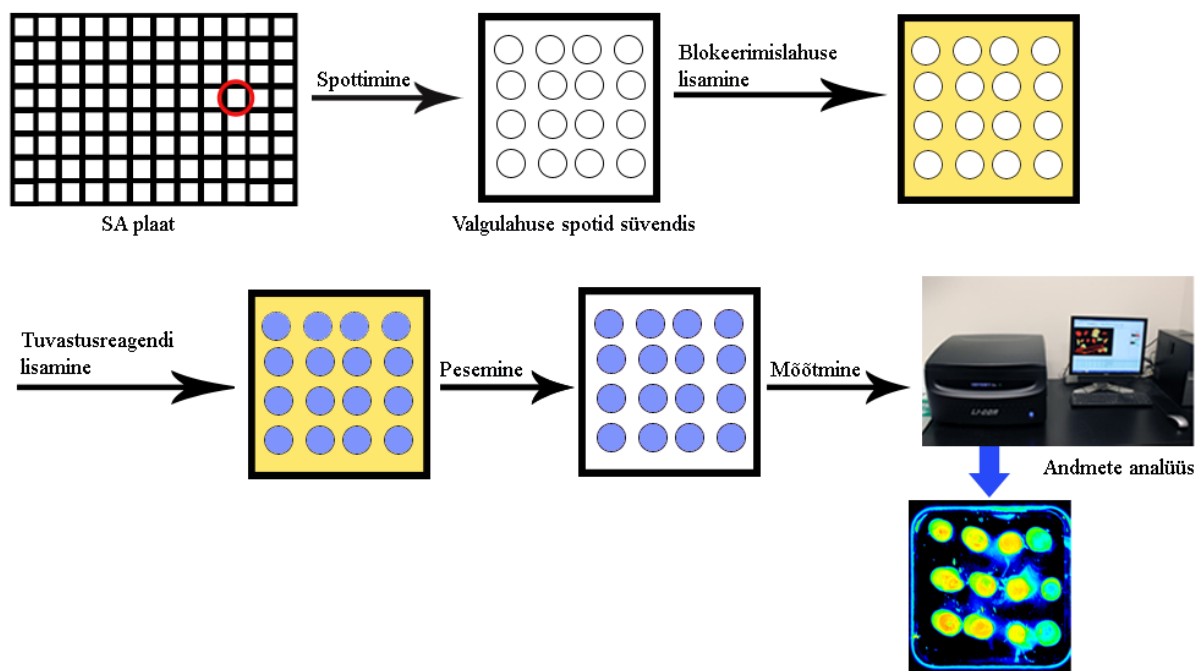
Jooniste 13 ja 14 põhjal on näha tuvastusreagentide lai usaldusväärsete kontsentratsioonide vahemik. IgG(PKAc)-AF647 signaalid on kõrgemad kui ARC-1063 puhul ja seetõttu saab antikeha kasutada madalamate kontsentratsioonide korral. Tuvastusreagenti kasutatava kontsentratsiooni saab valida vastavalt sellele, millisest analüüdi kontsentratsioonide vahemikust huvitatakse.

Erinevalt antikehast pole ARC-1063 selektiivne ja võimaldab ühes süvendis üheaegselt mitme kinaasi aktiivset kontsentratsiooni määrata. ARC-1063 korral suurenes tausta signaal kõrgematel kontsentratsioonidel kui 10 nM. Kõrge signaali ja madala taustsignaali tagamiseks valiti ARC-1063 kontsentratsiooniks 10 nM kinaaside aktiivsuse määramiseks järgmistes katsetes.

#### 4.7 Optimeerimiskatsete kokkuvõte

Iga katse süvend pestakse eelnevalt 100 µl MQ-veega ning inkubeeritakse 30 °C ning 300 RPM juures 5 minutit. Vedelik eemaldatakse osalise vaakumi all ja pind inkubeeritakse kuivaks ~ 20 minuti jooksul. Samal ajal valmistatakse ette kasutatavad lahused, spottide ja visualiseerimislahuse lahjendused tehakse HEPES-NaCl (2k) puhvriga, BSA lahustatakse MQ vees.

Plaadile kantakse pöördpipeteerimisega valgu proovi spotid ruumalaga 0,1 µl. Spottidel lastakse kuivada 5 minutit (Lisa 1). Seejärel lisatakse blokeerimislahus, 100 µl 2% BSA ning inkubeeritakse 5 minutit (Lisa 2). Blokeerimislahus eemaldatakse, lisatakse tuvastusreagent (10 nM ARC-i või antikeha lahus) ja inkubeeritakse 20 minutit (Lisa 3). Tuvastusreagent eemaldatakse ja süvend pestakse kaks korda 3k puhvriga ning üks kord MQ-veega. Selleks lisatakse kaevukesse 100 µl vastavat vedelikku ja inkubeeritakse iga vedelikuga 5 minutit. Lahus eemaldatakse pipetiga ning plaadil lastakse kuivada ~20 minutit. Mõõtmiseks kasutatakse fluorestsentskannerit (EX 685 nm, EM 700 nm), kasutades intensiivsust 7 (Lisa 4) ning mõõtmissügavust 1,5 mm. (Lisa 5) Analüüs teostatakse kohapeal programmiga Image Studio (Joonis 15). Katse teostamiseks kulub keskmiselt kaks tundi.

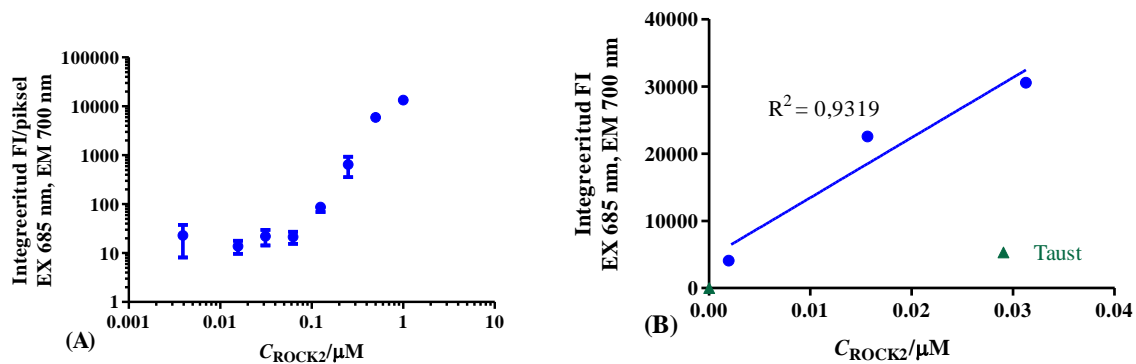


**Joonis 15.** Meetodi üldskeem. SA plaadi pinnale tehakse 100 nl 2k puhvris valmistatud valgu proovi spotid, lastakse kuivada 5 min. Pind blokeeritakse 2% BSA lahusega inkubeerides 5 minutit. Lisatakse 100 µl 2k puhvris valmistatud tuvastusreagent ning inkubeeritakse 15 minutit. Pind pestakse kaks korda 3k puhvriga ning üks kord MQ-veega. Mõõtmine teostatakse fluorestsentskanneril.

#### 4.8 Proteiinkinaaside kvantifitseerimine ARC-tüüpi sondidega ning aktiivse kinaasi hulga tuvastamine

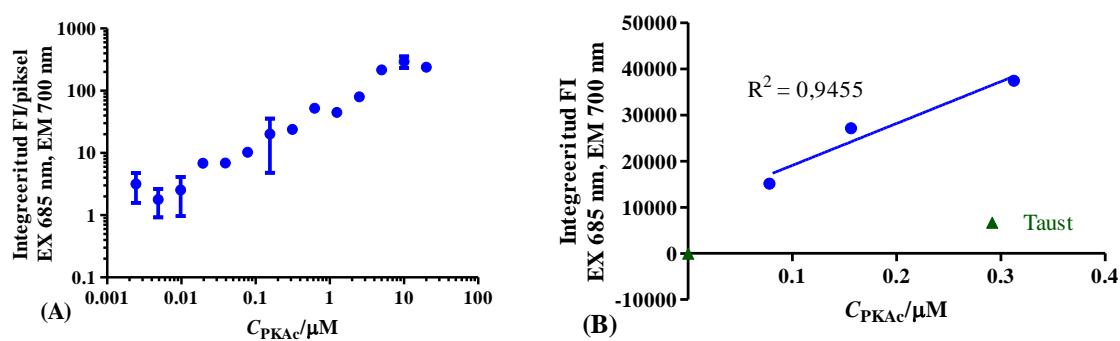
Töö eesmärgiks oli uurida adsorbeerunud kinaasi aktiivse hulga määramise võimalikkust ARC-sondiga (Lisa 9). Kuna ARC-1063 seondub vaid aktiivse kinaasiga ja kinaasi analüüsimisel pinnal sõltub signaal proportsionaalselt aktiivse kinaasi kontsentratsioonist, määrati aktiivsus eelnevalt sidumismeetodil. Sidumismeetodil leiti aktiivse kinaasi kontsentratsiooni osakaal ( $k$ ) kogu kinaasist hulgast ja arvestati seda LOD ja LOQ arvutustes.

Kõrgeim tundlikkus saavutati kinaasiga ROCK2 ( $k = 1$ ), mille LoD = 12,95 nM ja LoQ = 39,26 nM (Joonis 16). Madalama tundlikkusega võimaldas meetod tuvastada kinaase PKAc ( $k = 0,2$ ) (Joonis 17) ja MSK1 ( $k = 0,3$ ) (Joonis 18): PKAc LoD = 140 nM, LoQ = 426 nM; MSK1 LoD = 18,9 nM, LoQ = 57,3 nM.



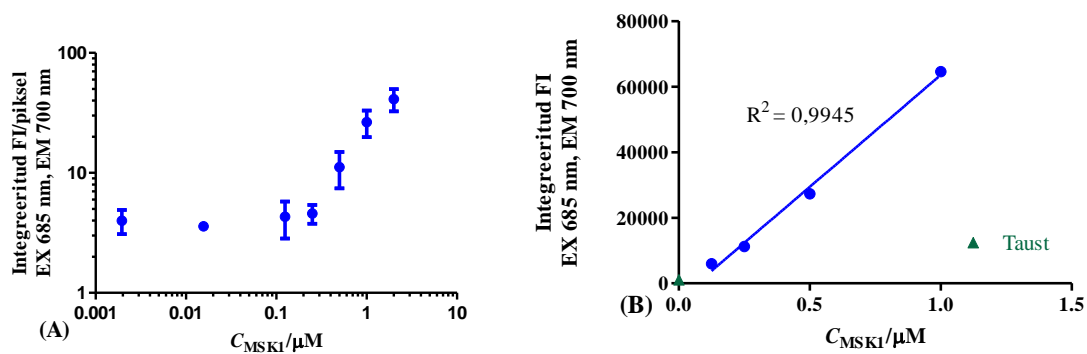
**Joonis 16.** Kinaasi ROCK2 lahjendusseeria, tuvastatud 10 nM ARC-1063-ga (A).

ROCK2:ARC-1063 signaal madalatel kontsentratsioonidel (B).



**Joonis 17.** Kinaasi PKAc lahjendusseeria, tuvastatud ARC-1063-ga (10 nM) (A). ARC-

1063:PKAc signaal madalatel kontsentratsioonidel (B).



**Joonis 18.** Kinaasi MSK1 lahjendusseeria, tuvastatud 10 nM ARC-1063-ga (A). Madalate

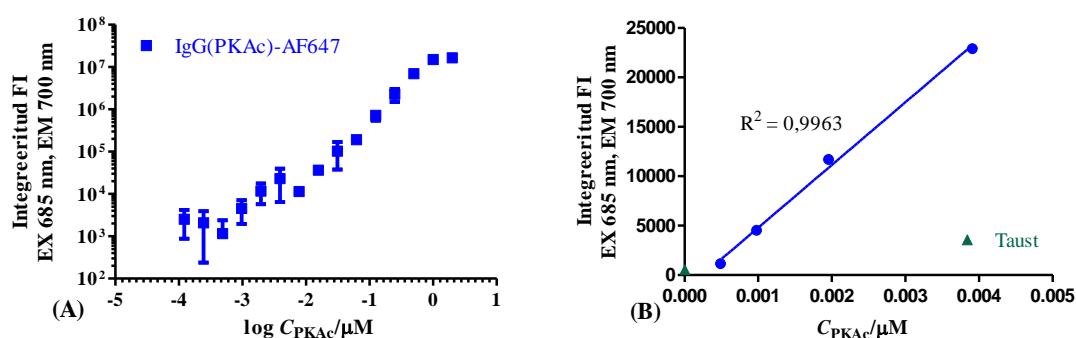
kontsentratsioonide MSK1:ARC-1063 signaal (B).



Meetodi määramispiirid on head, kuid signaalid paralleelspottides on võrdlemisi suure erinevusega. Seda võib põhjustada meetodi lihtne ülesehitus, milles spottimine toimub käsitsi, aga ka ARC-tüüpi sondi mittespetsiifiline seostumine pinnaga.

#### 4.9 PKAc määramise võrdlus ARC-sondi ning antikehaga

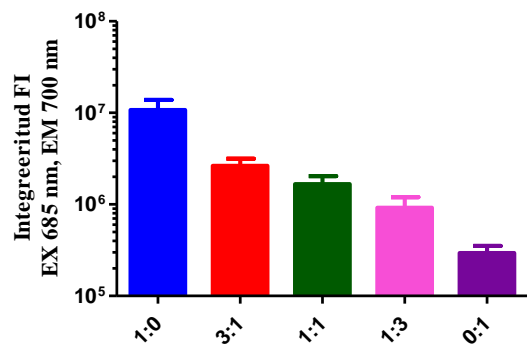
Antikehaga tuvastamisel on võimalik saavutada kõrgem PKAc kontsentratsiooni määramise tundlikkus kui ARC-iga tuvastamisel, kuna antikeha küljes oli kaks fluorestsentsvärvi (DOL 2,162) ning lisaks võib antikeha seostuda ka mitteaktiivse kinaasiga. Pinnale kanti PKAc lahjenduseeria (2  $\mu\text{M}$  kuni 0,06 nM) 100 nl ruumalas ja tuvastamiseks inkubeeriti 10 nM 100  $\mu\text{l}$  IgG(PKAc)-AF647-ga. Antikehaga tuvastamisel saadi kaks suurusjärku kõrgem maksimaalne fluorestsentsi intensiivsus (Joonis 19A) ja seejuures kaks suurusjärku madalam määramispiir (Joonis 19B) võrreldes ARC-1063-ga (alapunkt 4.8). Arvutatud LoD = 0,65 nM ning LoQ = 1,98 nM.



**Joonis 19.** Kinaasi PKAc lahjenduseeria, tuvastamine antikehaga IgG(PKAc)-AF647 (A). Madalate kontsentratsioonide PKAc:IgG(PKAc)-AF647 signaal (B).

#### 4.10 Antikeha selektiivsuse tuvastamine

Eelnevas katses selgus, et IgG(PKAc)-AF647 võimaldab määrata PKAc hulka pinnal väga kõrge tundlikkusega. Selleks, et uurida konkreetse antikeha võimet eristada aktiivset PKAc hulka koguhulgast, denatureeriti PKAc ning valmistati erinevas suhtes lahused aktiivsest ja denatureeritud PKAc-st (Joonis 20). Selgus, et IgG(PKAc)-AF647 on võimeline selgelt eristama ka denatureeritud ja aktiivset kinaasi ja on selektiivne aktiivse PKAc suhtes, lisaks näitas antikeha üles selektiivsust PKAc ja Pim2 kinaaside vahel (Lisa 7 ja Lisa 8).



**Joonis 20.** Aktiivse:denatureeritud PKAc suhe, mis tuvastati 25 nM IgG(PKAc)-ga.

## 5 Kokkuvõte

Töö eesmärgiks oli uurida ARC-tüüpi sondiga proteiinkinaasi aktiivse hulga määramise võimalikkust proovi pinnale adsorbeerimise kaudu.

Kirjanduse ülevaates tutvustati lühidalt proteiinkinaaside ning nende inhibiitorite, sealhulgas ARC-tüüpi inhibiitorite põhiaspekte. Lisaks anti ülevaade antikehadest, ELISA ja SPR meetoditest ning erinevatest valkude molekulaardiagnostikaks sobivatest pindadest.

Optimaalsete tingimuste leidmiseks uuriti muuhulgas erinevate pindade sidumismahtu, lahuse komponentide ja inkubeerimisaja pikkuse mõju erinevates katsetappides. Lisaks katsetati erinevaid tingimusi fluorestsentskanneril. Meetodi rakendatavust prooviti kolme kinaasiga, PKAc, ROCK2 ning MSK1, tehes pinnale lahjendusreeja spotid ning kasutades aktiivse hulga tuvastamiseks sondi ARC-1063. Kõige suurem tundlikkus saavutati kinaasiga ROCK2. Lisaks viidi läbi katse, milles pinnale kantud PKAc hulka määrati antikehaga IgG(PKAc)-AF647, et võrrelda ARC-1063-ga saadud tulemusi.

Kuigi ARC-sondi põhise tuvastusmeetodiga esinesid võrdlemisi suured erinevused paralleelkatsetes, leiti, et adsorbeerunud aktiivse PK analüüsimine on võimalik. Tutvustatav meetod on lihtsa teostatavusega ja võimaldab tuvastada väiksest proovi ruumalast (100 nl) aktiivse kinaasi hulka pikomoolides. Meetodit saab rakendada erinevate PK-de puhul paralleelselt ja töö käigus selgunud tingimuste mõju annab olulist teavet meetodi edasiarendamiseks ning ARC-sondide pinnakatsetes kasutamise kohta.

## 6 Summary

### **Spotting of protein kinases and quantification by ARC-type probes**

The aim of the current Bachelor's thesis was to study a novel method by adsorbing protein kinase (PK) onto a surface and determine the active concentration by ARC-type probe.

In the literature review, the main aspects and importance of protein kinases (PKs) and their inhibitors were introduced including adenosine analogue oligo-arginine conjugates (ARCs). In addition, the review of antibodies, ELISA and SPR method and also different surfaces used in protein molecular diagnostics was given.

Numerous tests were carried out to find out suitable components and concentrations of the solutions among other conditions in distinct phases of the experiment. The optimization of conditions allowed the detection of lower concentrations of the PKs in subsequent analyses. Three protein kinases, PKAc, ROCK2 and MSK1 were characterized in the novel method.

ARC-based detection entailed relatively large difference between parallels and non-specific signal showed irregularities. However, considering the simplicity of the method, the low volume and submicromolar detection limit allows the discovery of active concentration of the PK in picomoles. This study shows that the determination of active concentration of several PK-s is possible by simple adsorption of samples and detection by low-molecular ARC-probe in heterogeneous assay.

## 7 Kasutatud kirjandus

- (1) Graves, J. D.; Krebs, E. G. Protein Phosphorylation and Signal Transduction. *Pharmacol. Ther.* **1999**, 82 (2–3), 111–121.
- (2) Manning, G. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science* (80-. ). **2002**, 298 (5600), 1912–1934.
- (3) Rask-Andersen, M.; Zhang, J.; Fabbro, D.; Schiöth, H. B. Advances in Kinase Targeting: Current Clinical Use and Clinical Trials. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, 35 (11), 604–620.
- (4) Boudeau, J.; Miranda-Saavedra, D.; Barton, G. J.; Alessi, D. R. Emerging Roles of Pseudokinases. *Trends in Cell Biology*. 2006, pp 443–452.
- (5) Kannan, N.; Taylor, S. S. Rethinking Pseudokinases. *Cell* **2008**, 133 (2), 204–205.
- (6) Cohen, P. Protein Kinases - the Major Drug Targets of the Twenty-First Century? *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, 1 (April), 309–315.
- (7) Noble, M. E. M.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. Protein Kinase Inhibitors : Insights into Drug Design from Structure. **2004**, 303 (5665), 1800–1805.
- (8) Pelech, S. Tracking Cell Signaling Protein Expression and Phosphorylation by Innovative Proteomic Solutions. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2004**, 5 (1), 69–77.
- (9) Hanks, S. K. Genomic Analysis of the Eukaryotic Protein Kinase Superfamily: A Perspective. *Genome Biol.* **2003**, 4 (5), 111.
- (10) Hanks, S. K.; Hunter, T. Protein Kinases 6. The Eukaryotic Protein Kinase Superfamily: Kinase (Catalytic) Domain Structure and Classification. *FASEB J.* **1995**, 9 (8), 576–596.
- (11) Pinna, L. A.; Ruzzene, M. How Do Protein Kinases Recognize Their Substrates? *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1996**, 1314 (3), 191–255.
- (12) Pearce, L. R.; Komander, D.; Alessi, D. R. The Nuts and Bolts of AGC Protein Kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, 11 (1), 9–22.
- (13) Taylor, S. S.; Kim, C.; Vigil, D.; Haste, N. M.; Yang, J.; Wu, J.; Anand, G. S. Dynamics of Signaling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2005**, 1754 (1–2), 25–37.
- (14) Zhang, W.; Morris, G. Z.; Beebe, S. J. Characterization of the cAMP-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit Cgamma Expressed and Purified from sf9 Cells. *Protein Expr. Purif.* **2004**, 35 (1), 156–159.
- (15) Johnson, D. A.; Akamine, P.; Radzio-Andzelm, E.; Madhusudan, M.; Taylor, S. S. Dynamics of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Chem. Rev.* **2001**, 101 (8), 2243–2270.
- (16) Nakagawa, O.; Fujisawa, K.; Ishizaki, T.; Saito, Y.; Nakao, K.; Narumiya, S. ROCK-I and ROCK-II, Two Isoforms of Rho-Associated Coiled-Coil Forming Protein Serine/threonine Kinase in Mice. *FEBS Lett.* **1996**, 392 (2), 189–193.
- (17) Fujisawa, K.; Fujita, A.; Ishizaki, T.; Saito, Y.; Narumiya, S.; Ishizaki, G. R.; Saito, N. Identification of the Rho-Binding Domain of p160 ROCK , a Rho-Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase \* Vated When Bound to the GTP-Bound Form of the

Small. *Biochemistry* **1996**, 271 (38), 23022–23028.

- (18) Takahashi, N.; Tuiki, H.; Saya, H.; Kaibuchi, K. Localization of the Gene Coding for ROCK II/Rho Kinase on Human Chromosome 2p24. *Genomics* **1999**, 55 (2), 235–237.
- (19) Olson, M. F. Applications for ROCK Kinase Inhibition. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008, pp 242–248.
- (20) Deak, M.; Clifton, A. D.; Lucocq, J. M.; Alessi, D. R. Mitogen- and Stress-Activated Protein Kinase-1 (MSK1) Is Directly Activated by MAPK and SAPK2/p38, and May Mediate Activation of CREB. *EMBO J.* **1998**, 17 (15), 4426–4441.
- (21) Pierrat, B.; Correia, S.; Mary, J.; Toma, M.; Lesslauer, W. RSK-B , a Novel Ribosomal S6 Kinase Family Member , Is a CREB Kinase under Dominant Control of p38 □ Mitogen-Activated Protein Kinase ( p38 □ MAPK )\*. *J. Biol. Chem.* **1998**, 273 (45), 29661–29671.
- (22) Jin, Y.; Wang, Y.; Walker, D. L.; Dong, H.; Conley, C.; Johansen, J.; Johansen, K. M. JIL-1: A Novel Chromosomal Tandem Kinase Implicated in Transcriptional Regulation in Drosophila. *Mol. Cell* **1999**, 4 (1), 129–135.
- (23) Caenepeel, S.; Charydczak, G.; Sudarsanam, S.; Hunter, T.; Manning, G. The Mouse Kinome: Discovery and Comparative Genomics of All Mouse Protein Kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, 101 (32), 11707–11712.
- (24) Balbaa, M.; Sayed, E.; Ashry, H. El. Biochemistry & Physiology : Open Access Enzyme Inhibitors as Therapeutic Tools. *Enzyme* **2012**, 1 (2), 1–8.
- (25) Wang, H.; Li, M.; Lin, W.; Wang, W.; Zhang, Z.; Rayburn, E. R.; Lu, J.; Chen, D.; Yue, X.; Shen, F.; et al. Extracellular Activity of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase as a Biomarker for Human Cancer Detection: Distribution Characteristics in a Normal Population and Cancer Patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2007**, 16 (4), 789–795.
- (26) Wu, P.; Nielsen, T. E.; Clausen, M. H. Small-Molecule Kinase Inhibitors: An Analysis of FDA-Approved Drugs. *Drug Discov. Today* **2016**, 21 (1), 5–10.
- (27) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, 64 (SUPPL.), 4–17.
- (28) Lavogina, D.; Enkvist, E.; Uri, A. Bisubstrate Inhibitors of Protein Kinases: From Principle to Practical Applications. *ChemMedChem* **2010**, 5 (1), 23–34.
- (29) Hidaka, H.; Inagaki, M.; Kawamoto, S.; Sasaki, Y. Isoquinolinesulfonamides, Novel and Potent Inhibitors of Cyclic Nucleotide Dependent Protein Kinase and Protein Kinase C. *Biochemistry* **1984**, 23 (21), 5036–5041.
- (30) Fischer, P. M. The Design of Drug Candidate Molecules as Selective Inhibitors of Therapeutically Relevant Protein Kinases. *Curr. Med. Chem.* **2004**, 11 (12), 1563–1583.
- (31) Cohen, P. Protein Kinase Inhibitors for the Treatment of Disease : The Promise and the Problems. **2005**, 1–7.
- (32) Lawrence, D. S. New Design Strategies for Ligands That Target Protein Kinase-Mediated Protein – Protein Interactions. *Inhib. Protein Kinases Protein Phosphates* **2005**, 11–45.

- (33) Bogoyevitch, M. A.; Barr, R. K.; Ketterman, A. J. Peptide Inhibitors of Protein Kinases - Discovery, Characterisation and Use. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2005**, 1754 (1–2), 79–99.
- (34) Parang, K.; Cole, P. A. Designing Bisubstrate Analog Inhibitors for Protein Kinases. *Pharmacol. Ther.* **2002**, 93 (2–3), 145–157.
- (35) Lavogina, D.; Lust, M.; Viil, I.; König, N.; Raidaru, G.; Rogozina, J.; Enkvist, E.; Uri, A.; Bossemeyer, D. Structural Analysis of ARC-Type Inhibitor (ARC-1034) Binding to Protein Kinase A Catalytic Subunit and Rational Design of Bisubstrate Analogue Inhibitors of Basophilic Protein Kinases. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (2), 308–321.
- (36) Uri, A.; Raidaru, G.; Subbi, J.; Padari, K.; Pooga, M. Identification of the Ability of Highly Charged Nanomolar Inhibitors of Protein Kinases to Cross Plasma Membranes and Carry a Protein into Cells. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2002**, 12 (16), 2117–2120.
- (37) Viht, K.; Padari, K.; Raidaru, G.; Subbi, J.; Tammiste, I.; Pooga, M.; Uri, A. Liquid-Phase Synthesis of a Pegylated Adenosine-Oligoarginine Conjugate, Cell-Permeable Inhibitor of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2003**, 13 (18), 3035–3039.
- (38) Kasari, M.; Ligi, K.; Williams, J. A. G.; Vaasa, A.; Enkvist, E.; Viht, K.; Pålsson, L. O.; Uri, A. Responsive Microsecond-Lifetime Photoluminescent Probes for Analysis of Protein Kinases and Their Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2013**, 1834 (7), 1330–1335.
- (39) Enkvist, E.; Vaasa, A.; Kasari, M.; Kriisa, M.; Ivan, T.; Ligi, K.; Raidaru, G.; Uri, A. Protein-Induced Long Lifetime Luminescence of Nonmetal Probes. *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6 (10), 1052–1062.
- (40) Vaasa, A.; Lust, M.; Terrin, A.; Uri, A.; Zaccolo, M. Small-Molecule FRET Probes for Protein Kinase Activity Monitoring in Living Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 397 (4), 750–755.
- (41) Loog, M.; Uri, A.; Järvi, J.; Ek, P. Bi-Substrate Analogue Ligands for Affinity Chromatography of Protein Kinases. *FEBS Lett.* **2000**, 480 (2–3), 244–248.
- (42) Viht, K.; Schweinsberg, S.; Lust, M.; Vaasa, A.; Raidaru, G.; Lavogina, D.; Uri, A.; Herberg, F. W. Surface-Plasmon-Resonance-Based Biosensor with Immobilized Bisubstrate Analog Inhibitor for the Determination of Affinities of ATP- and Protein-Competitive Ligands of cAMP-Dependent Protein Kinase. *Anal. Biochem.* **2007**, 362 (2), 268–277.
- (43) Vaasa, A.; Viil, I.; Enkvist, E.; Viht, K.; Raidaru, G.; Lavogina, D.; Uri, A. High-Affinity Bisubstrate Probe for Fluorescence Anisotropy Binding/displacement Assays with Protein Kinases PKA and ROCK. *Anal. Biochem.* **2009**, 385 (1), 85–93.
- (44) Uri, A.; Lust, M.; Vaasa, A.; Lavogina, D.; Viht, K.; Enkvist, E. Bisubstrate Fluorescent Probes and Biosensors in Binding Assays for HTS of Protein Kinase Inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **2010**, 1804 (3), 541–546.
- (45) Carter, P. J. Potent Antibody Therapeutics by Design. *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, 6 (5), 343–357.
- (46) Lipman, N. S.; Jackson, L. R.; Weis-Garcia, F.; Trudel, L. J. Monoclonal versus Polyclonal Antibodies: Distinguishing Characteristics, Applications, and Information

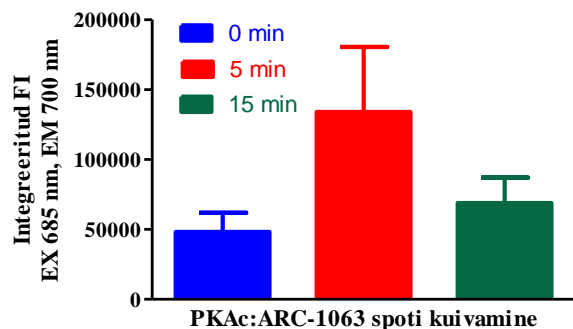
Resources. *ILAR J.* **2005**, 46 (3), 258–268.

- (47) Georgiou, G.; Ippolito, G. C.; Beausang, J.; Busse, C. E.; Wardemann, H.; Quake, S. R. The Promise and Challenge of High-Throughput Sequencing of the Antibody Repertoire. *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32 (2), 158–168.
- (48) Sela-Culang, I.; Kunik, V.; Ofran, Y. The Structural Basis of Antibody-Antigen Recognition. *Front. Immunol.* **2013**, 4 (OCT).
- (49) Conroy, P. J.; Hearty, S.; Leonard, P.; Kennedy, R. J. O. Seminars in Cell & Developmental Biology Antibody Production , Design and Use for Biosensor-Based Applications. **2009**, 20, 10–26.
- (50) Brekke, O. H.; Sandlie, I. Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. **2003**, 2 (January), 52–62.
- (51) Padoa, C. J.; Crowther, N. J. Engineered Antibodies : A New Tool for Use in Diabetes Research. **2006**.
- (52) Saper, C. B. A Guide to the Perplexed on the Specificity of Antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* **2009**, 57 (1), 1–5.
- (53) O’Kennedy, R. O.; Byrne, M.; Fagain, O.; Berns, G. Experimental Section: A Review of Enzyme-Immunoassay and a Description of a Competitive Enzym. **1990**, 18 (3), 140–30.
- (54) Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Quantitative Assay of Immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, 8 (9), 871–874.
- (55) Aydin, S. A Short History, Principles, and Types of ELISA, and Our Laboratory Experience with Peptide/protein Analyses Using ELISA. *Peptides* **2015**, 72, 4–15.
- (56) Hornbeck, P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Curr. Protoc. Immunol.* **2001**, Chapter 2, Unit 2.1.
- (57) Revoltella, R. P.; Laricchia Robbio, L.; Liedberg, B. Comparison of Conventional Immunoassays (RIA, ELISA) with Surface Plasmon Resonance for Pesticide Detection and Monitoring. *Biotherapy* **1998**, 11 (2–3), 135–145.
- (58) Van Weemen, B. K.; Schuurs, A. H. W. M. Immunoassay Using Antigen-Enzyme Conjugates. *FEBS Lett.* **1971**, 15 (3), 232–236.
- (59) Engvall, E. The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clin. Chem.* **2010**, 56 (2), 319–320.
- (60) Lindström, P.; Wager, O. IgG Autoantibody to Human Serum Albumin Studied by the ELISA Technique. *Scand. J. Immunol.* **1978**, 7 (5), 419–425.
- (61) Kato, K.; Hamaguchi, Y.; Okawa, S.; Ishikawa, E.; Katunuma, N. Use of Rabbit Antibody Glass IgG Bound for the onto Plain and Aminoalkylsilyl Immunoassay of Engvall and Perlmann Have Developed the Enzyme- Linked Immunoassay Sulfonic Acid ( Sodium ( Tokyo Kasei Kogyo Co ., Ltd ., Tokyo ) by the Dinitrophenyl Molecules . **1977**, 82 (1), 261–266.
- (62) Yorde, D. E.; Sasse, E. A.; Wang, T. Y. Competitive Enzyme Linked Immunoassay with Use of Soluble Enzyme/antibody Immune Complexes for Labeling. I. Measurement of Human Choriogonadotropin. *Clin. Chem.* **1976**, 22 (8), 1372–1377.

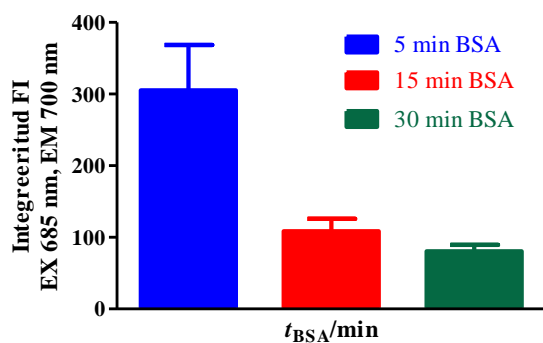


- (63) Malmqvist, M. BIACORE: An Affinity Biosensor System for Characterization of Biomolecular Interactions. *Biochem. Soc. Trans.* **1999**, 27 (2), 335–340.
- (64) Englebienne, P.; Hoonacker, A. Van; Verhas, M. Surface Plasmon Resonance: Principles, Methods and Applications in Biomedical Sciences. *Spectroscopy* **2003**, 17, 255–273.
- (65) Boozer, C.; Kim, G.; Cong, S.; Guan, H.; Londergan, T. Looking towards Label-Free Biomolecular Interaction Analysis in a High-Throughput Format: A Review of New Surface Plasmon Resonance Technologies. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2006**, 17 (4), 400–405.
- (66) Homola, J.; Yee, S. S.; Gauglitz, G. Surface Plasmon Resonance Sensors: Review. *Sensors Actuators B Chem.* **1999**, 54 (1), 3–15.
- (67) Gesellchen, F.; Zimmermann, B.; Herberg, F. W. Direct Optical Detection of Protein – Ligand Interactions. *Methods Mol. Biol.* **2005**, 305, 17–46.
- (68) Davis, T. M.; Wilson, W. D. Determination of the Refractive Index Increments of Small Molecules for Correction of Surface Plasmon Resonance Data. *Anal. Biochem.* **2000**, 284 (2), 348–353.
- (69) McDonnell, J. M. Surface Plasmon Resonance: Towards an Understanding of the Mechanisms of Biological Molecular Recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, 5 (5), 572–577.
- (70) Robelek, R. Surface Plasmon Resonance Sensors in Cell Biology: Basics and Application. *Bioanal. Rev.* **2009**, 1 (1), 57–72.
- (71) Moll, D.; Schweinsberg, S.; Hammann, C.; Herberg, F. W. Comparative Thermodynamic Analysis of Cyclic Nucleotide Binding to Protein Kinase A. *Biol. Chem.* **2007**, 388 (2), 163–172.
- (72) Rusmini, F.; Zhong, Z.; Feijen, J. Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips. *Biomacromolecules* **2007**, 8 (6), 1775–1789.
- (73) Rao, S. V.; Anderson, K. W.; Bachas, L. G. Oriented Immobilization of Proteins. *Mikrochim. Acta* **1998**, 128 (3–4), 127–143.
- (74) Ekins, R. P.; Chu, F. W. Multianalyte Microspot Immunoassay - Microanalytical compact Disk'' of the Future. *Clin. Chem.* **1991**, 37 (11), 1955–1967.

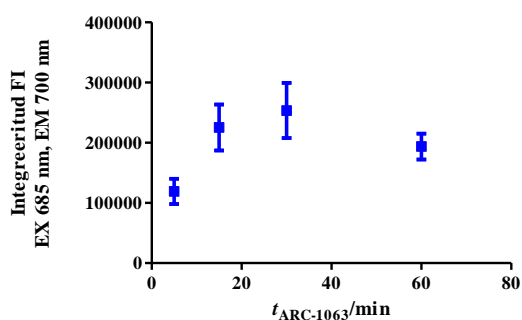
## 8 Lisad



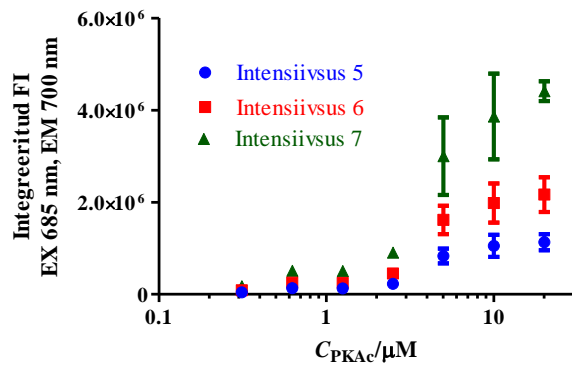
**Lisa 1.** ARC-1063:PKAc spoti kuivamise aeg. Kõige kõrgem intensiivsus saavutati, kui spotil lasti kuivada 5 minutit.



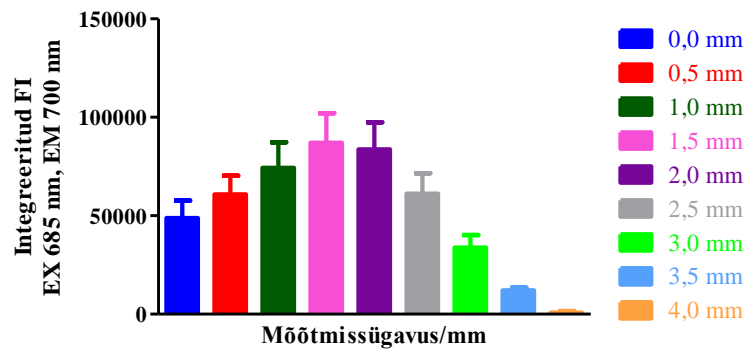
**Lisa 2.** BSA lahuse inkubatsiooniaja mõju ARC-1063:PKAc spottide signaalile. Kõrgeima intensiivsuse andis 5 minutit BSA lahusega inkubeerimine.



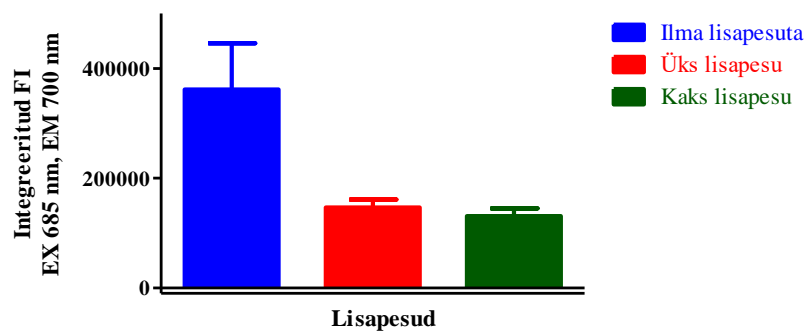
**Lisa 3.** ARC-i lahuse inkubatsiooniaja mõju ARC-1063:PKAc spoti signaalile. Platoo saabus 15 minuti juures.



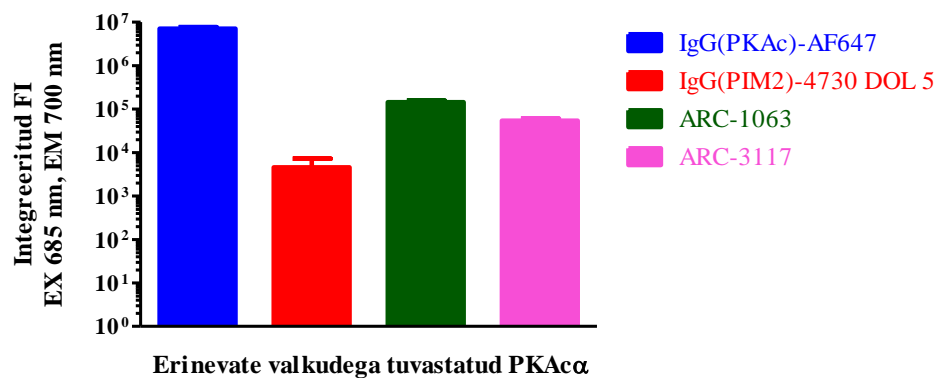
**Lisa 4.** Erinevate intensiivsuste katsetamine fluorestsentskanneril. Kõrgeim signaal saavutati intensiivsusega 7.



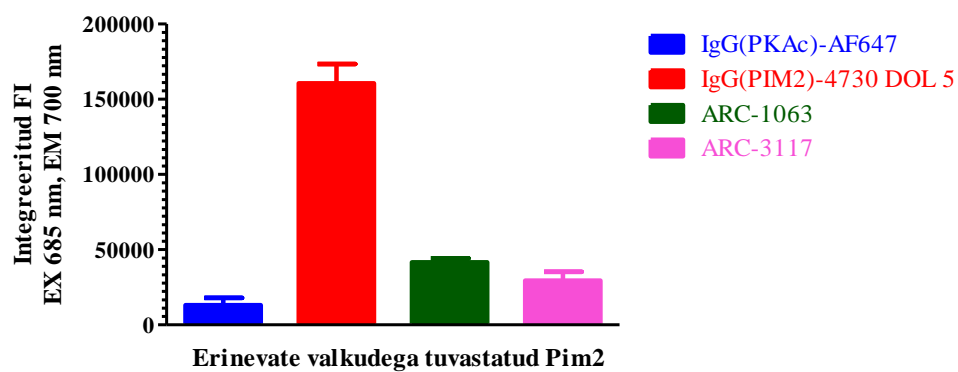
**Lisa 5.** Erinevate mõõtmisügavuste katsetamine ARC-1063:PKAc signaalile. Kõrgeim intensiivsus saavutati 1,5 mm mõõtmisügavusega.



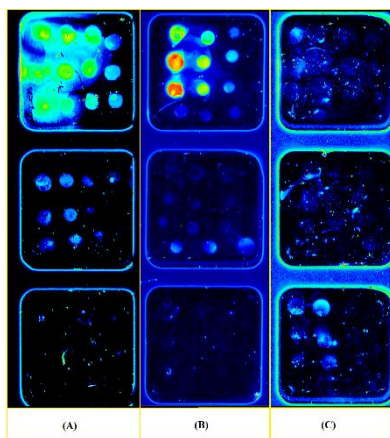
**Lisa 6.** Lisapesude mõju ARC-1063:PKAc spottide intensiivsusele. Kõige kõrgemad signaalid saavutati ilma lisapesuta.



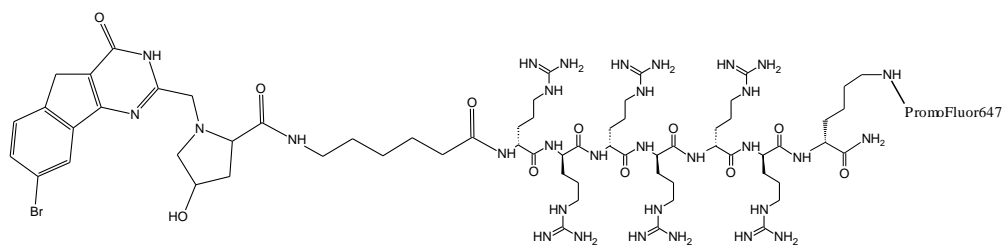
**Lisa 7.** Kinaasi PKA $\alpha$  tuvastamine antikehadega ning ARC-idega. Kõrgem signaal saavutati IgG(PKAc)-AF647 antikehaga ning ARC-1063-ga.



**Lisa 8.** Kinaasi Pim2 tuvastamine antikehadega ning ARC-idega. Kõige kõrgem intensiivsus saavutati IgG(Pim2)-4730 DOL 5 antikehaga.



**Lisa 9.** Kinaaside PKAc (A), ROCK2 (B) ning MSK1 (C) spottide lahjendusseeria, tuvastatud 10 nM ARC-1063.



**Lisa 10.** ARC-3117 structuur

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, **Hegne Pupart**,

*(autori nimi)*

annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose „**Proteiinkinaaside spottimine pinnale ja kvantifitseerimine ARC-tüüpi sondiga**“,

*(lõputöö pealkiri)*

mille juhendaja on **Taavi Ivan**,

*(juhendaja nimi)*

reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni; üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 24.05.2017